



Espacenet

Bibliographic data: WO 0202762 (A1)

NOVEL LIPASE

Publication date: 2002-01-10

Inventor(s): INOUE KEIZO [JP]; ARAI HIROYUKI [JP]; AOKI JUNKEN [JP] +

Applicant(s): MOCHIDA PHARM CO LTD [JP]; INOUE KEIZO [JP]; ARAI HIROYUKI [JP]; AOKI JUNKEN [JP] +

Classification:
 - international: C07K16/40; C12N15/55; C12N9/16; A61K38/00; (IPC1-7): A61K38/43; C07K16/40; C12N15/55; C12N9/16
 - European: C07K16/40; C12N9/16

Application number: WO2000JP04441 20000703

Priority number (s): WO2000JP04441 20000703

Also published as:
 • EP 1298205 (A1)
 • CA 2418191 (A1)

Cited documents: JP10201479 (A) [View all](#)

Abstract of WO 0202762 (A1)

A novel phospholipase A1 (PLA1) having a substrate specificity to phosphatidic acid (PA); a peptide or a polypeptide originating in the above novel PLA1; a polynucleotide encoding the peptide or polypeptide originating in the novel PLA1; a process for producing the peptide or polypeptide originating in the novel PLA1; an antibody against the peptide or polypeptide originating in the novel PLA1; a method of identifying an inhibitor, an antagonist or an activator of the novel PLA1 by using the same; compounds identified by the above method; and medicinal compositions and diagnostic methods by using the same.

Last updated: 12.10.2011 Worldwide Database 5.7.23.1, 92p

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 1 月 10 日 (10.01.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/02762 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 9/16, 15/55, [JP/JP]; 〒112-0002 東京都文京区小石川5丁目35番8号
C07K 16/40, A61K 38/43 クレアホームズ604号室 Tokyo (JP). 青木淳賢 (AOKI,
Junkun) [JP/JP]; 〒154-0002 東京都世田谷区下馬2丁目
(21) 国際出願番号: PCT/JP00/04441 21番25号 中銀世田谷マンション2号棟306号室 Tokyo
(JP).
(22) 国際出願日: 2000 年 7 月 3 日 (03.07.2000) (74) 代理人: 庄司 隆 (SHOJI, Takashi); 〒101-0032 東京
都千代田区岩本町3丁目2番10号 SN岩本町ビル 6階
(25) 国際出願の言語: 日本語 Tokyo (JP).
(26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): CA, JP, US.
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 持田製 薬株式会社 (MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
LTD.) [JP/JP]; 〒160-8515 東京都新宿区四谷一丁目7 DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
番地 Tokyo (JP). 添付公開書類:
— 国際調査報告書
(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 井上圭三 (INOUE, 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
Keizo) [JP/JP]; 〒357-0041 埼玉県飯能市美杉台5丁目2 各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
番7号 301号室 Saitama (JP). 新井洋由 (ARAI, Hiroyuki) のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL LIPASE

(54) 発明の名称: 新規リパーゼ

(57) Abstract: A novel phospholipase A₁ (PLA₁) having a substrate specificity to phosphatidic acid (PA); a peptide or a polypeptide originating in the above novel PLA₁; a polynucleotide encoding the peptide or polypeptide originating in the novel PLA₁; a process for producing the peptide or polypeptide originating in the novel PLA₁; an antibody against the peptide or polypeptide originating in the novel PLA₁; a method of identifying an inhibitor, an antagonist or an activator of the novel PLA₁ by using the same; compounds identified by the above method; and medicinal compositions and diagnostic methods by using the same.

(57) 要約:

本発明は、ホスファチジン酸 (P A) に対する基質特異性を有する新規なホス
ホリパーゼ A₁ (P L A₁) および該新規 P L A₁ 由来のペプチドまたはポリペプ
チド、新規 P L A₁ 由来のペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレ
オチド、新規 P L A₁ 由来のペプチドまたはポリペプチドの製造法、新規 P L A₁
由来のペプチドまたはポリペプチドに対する抗体、およびこれらを利用して新規
P L A₁ の阻害剤、拮抗剤、賦活剤の同定を行なう方法、さらにこの方法で同定
された化合物を提供することであり、またこれらを利用した医薬組成物および診
断方法を提供する。



WO 02/02762 A1

1

明 細 書

新規リパーゼ

技術分野

- 5 本発明は、新規なリパーゼ、特にホスホリパーゼ A_1 (phospholipase A_1 ; 以下 PLA_1 と呼ぶこともある) に関するものである。さらに詳しくは、新規 PLA_1 のアミノ酸配列の全部または一部を有するペプチドまたはポリペプチド、該ペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターで形質転換された形質転換体、該形質転換体を使ったペプチドまたはポリペプチドの製造方法、
10 該ペプチドまたはポリペプチドに対する抗体、これらを利用した化合物の同定方法、該同定された化合物、該ポリペプチドもしくは該ポリヌクレオチドに作用する活性阻害化合物または活性賦活化合物、これらに関する医薬組成物とその製造方法およびこの医薬組成物を用いた治療方法、並びにこれらに関する疾病診
15 断方法に関する。

背景技術

- PLA_1 は、グリセロリン脂質のグリセロール 1 位のエステル結合を加水分解する酵素である。これまでに様々な臓器でこの酵素活性の存在が検出されており、
20 また基質特異性により区別されるいくつかの PLA_1 が報告されている。cDNA クローニングされているものとしては、蜂毒の PLA_1 (Dolm1)、PS- PLA_1 [ホスファチジルセリン (PS) およびリゾホスファチジルセリン (lysophospholipid) のグリセロールの 1 位のエステル結合を特異的に加水分解する (特開平 10-201479 号) (蛋白質 核酸 酵素, 44, 1038-1042, 1999)]、ヒト精巢の PA- PLA_1 [ホスファチジン酸 (PA) のグリセロールの 1 位のエステル結合を特異的に加水分解する (J. Biol. Chem., 273, 5468-5477, 1998)] 等がある。また、リパーゼファミリー

の分子は、しばしばトリアシルグリセロールを分解する活性以外に、PLA₁活性を併せ持つことが知られている (FEBS Letters, 320, 145-149, 1993) (Biochemistry, 32, 4702-4707, 1993) (J. Biol. Chem., 272, 2192-2198, 1997)。

5 さらに、これまでに見つかっているリパーゼファミリーに属するPLA₁は全て、短いリッド (Lid) (B. B. A., 1376, 417-432, 1998) (Biochemistry, 32, 4702-4707, 1993) を有するが、その生理的意義は必ずしも明らかになっていない。また、リパーゼ分子上の糖鎖がリパーゼ活性に関与する可能性が示唆されている (J. Lipid Res., 35, 1511-1523, 1994) (J. Lipid Res., 36, 939-951, 1995)。

PLA₁の機能の一つにリン脂質 (phospholipid) を分解する作用があるが、生成物のひとつであるリゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid; 以下LPAと略称することもある) (B. B. A., 15 1198, 185-196, 1994) には多くの生理活性が知られており、生物学的有用性において着目されている〔細胞工学, 17, (5), 739-745, 1998〕。LPAの主要な作用としては、血圧の上昇作用 (Lipids, 13, 572-574, 1978)、血小板凝集作用 (Am. J. Pathol., 96, 423-438, 1979)、細胞増殖促進作用 (Cell, 59, 45-54, 20 1989) があり、またこれら以外にも、ガン細胞の浸潤促進、細胞接着、ストレスファイバーの形成、化学走性誘発、神経突起の退縮、アポトーシスの抑制、創傷治癒への関連等多様な作用が報告されている (B. B. A., 1198, 185-196, 1994)。

ホスファチジン酸 (phosphatidic acid; 以下、PAと略称 25 することもある) に対して特異性を持つPLA₁としては、ヒト精巣PA-PLA₁が知られており、cDNAもクローニングされているが、新規PLA₁は細胞内の酵素であり、リン脂質代謝の中心であるホスファチジン酸のsn-1位の脂

肪酸の代謝回転を決定する因子として捉えられている (J. Biol. Chem., 273, 5468-5477, 1998)。また、ヒト精巣 P A-P L A₁ は反応条件によっては、ホスファチジルエタノールアミン (P E)、ホスファチジリンシトール (P I) も加水分解することが報告されている。

- 5 本発明は、上記のように多様な、ある局面においてはむしろ悪益な作用の原因物質となり得る L P A の産生触媒たる P L A₁ に関する新規な物質を見だし、生体内における L P A の制御を可能にすることを目的のひとつとするものである。

発明の開示

- 10 本発明は、(1) 下記の群より選ばれるポリペプチド；
- ①配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列で示されるポリペプチド、
 - ②前記①のポリペプチドを含有するポリペプチド、
 - ③前記①のポリペプチドと少なくとも約 70% のアミノ酸配列上の相同性を有しかつホスファチジン酸を分解する活性を有するポリペプチド、
- 15 および
- ④前記アミノ酸配列において 1 ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加あるいは挿入といった変異を有し、かつホスファチジン酸を分解する活性を有するポリペプチド、(2)配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の少なくとも約 8 個の連続するアミノ酸配列を有するペプチド、(3)前記 1 または 2 のポリペプチドまたはペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖、(4)前記 3 のポリヌクレオチドまたはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド、(5)配列表の配列番号 2 に記載の塩基配列またはその相補的配列の少なくとも約 15 個の連続する塩基配列で示されるポリヌクレオチド、(6)前記 3 ないし 5 の何れかのポリヌクレオチドを含有する組換えベ
- 20 クター、(7) 前記 6 の組換えベクターで形質転換された形質転換体、(8) 前記 7 の形質転換体を培養する工程を含む、前記 1 または 2 のポリペプチドまたはペプチドの製造方法、(9)前記 1 または 2 のポリペプチドまたはペプチドを免疫学

的に認識する抗体、(10)ホスファチジン酸を分解する活性を抑制する、前記9の抗体、(11)前記1のポリペプチドと相互作用してその活性を阻害もしくは活性化する化合物、および/または前記3もしくは4のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物の同定方法であって、前記1または2のポリペプチドもしくはペプチド、前記3ないし5の何れかのポリヌクレオチド、前記6のベクター、前記7の形質転換体、前記9もしくは10の抗体のうち、少なくとも何れか一つを用いることを特徴とする方法、(12)前記1のポリペプチドと相互作用してその活性を阻害もしくは活性化する化合物、または前記3もしくは4のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物の同定方法であって、化合物とポリペプチドまたはポリヌクレオチドとの間の相互作用を可能にする条件下で、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドとスクリーニングすべき化合物とを接触させて化合物の相互作用を評価し(かかる相互作用はポリペプチドまたはポリヌクレオチドと化合物との相互作用に応答した検出可能シグナルを提供し得る第2の成分に関連したものである)、次いで、化合物とポリペプチドまたはポリヌクレオチドとの相互作用により生じるシグナルの存在または不存在またはその変化を検出することにより、化合物がポリペプチドまたはポリヌクレオチドと相互作用して、その活性を活性化または阻害するかどうかを決定することを含む方法、(13)前記1のポリペプチドまたは前記3もしくは4のポリヌクレオチドの活性または生理学的作用を阻害もしくは活性化する化合物の同定方法であって、前記7の形質転換体と、該形質転換体中で発現される前記1のポリペプチドがホスファチジン酸に作用することにより生産されるリゾホスファチジン酸に対する受容体を発現させた別の形質転換体とを用い、化合物とこれら形質転換体の相互作用を可能にする条件下で、これら形質転換体とスクリーニングすべき化合物とを接触させて化合物の相互作用を評価し(かかる作用は形質転換体と化合物との相互作用に応答した検出可能シグナルを提供し得る第2の成分に関連したものである)、次いで、化合物と形質転換体との相互作用により生じるシグナルの存在または不存在またはその変化を検出することにより、

5

化合物がポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性または生理学的作用を、活性化または阻害するかどうかを決定することを含む方法、(14)前記11ないし13の方法で同定される化合物、(15)前記1のポリペプチドと相互作用してその活性を阻害もしくは活性化する化合物、または前記3もしくは4のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物、(16)前記1または2のポリペプチドもしくはペプチド、前記3ないし5の何れかのポリヌクレオチド、前記6のベクター、前記7の形質転換体、前記9もしくは10の抗体、または前記14もしくは15の化合物のうち、少なくとも何れか一つを含有することを特徴とする医薬組成物、(17)個体における前記1のポリペプチドの発現または活性に関連した疾病の診断方法であって、(a)該ポリペプチドをコードしている核酸配列、および／または(b)個体由来の試料中の該ポリペプチドをマーカーとして分析することを含む方法、(18)前記16の医薬組成物をホスホリパーゼA₁に関連する疾患に用いることを特徴とする治療方法、(19)前記16の医薬組成物の製造方法、からなる。

5

図面の簡単な説明

図1は、新規PLA₁の塩基配列とESTデータベースから得られた塩基配列の関係を説明する図である。図中、ATGは開始コドン、S、D、Hは活性トライアド、C-Cはリッド領域、EST配列中の破線はEST塩基配列の欠失がある領域である。

図2は、新規PLA₁の配列およびその配列の特徴を説明する図である。図中、二重下線はシグナル配列、下線は糖鎖付加予測部位、両矢印の下線はリパーゼコンセンサス配列およびリッド領域、四角(斜線入り)で囲んだS、D、Hは活性トライアド、四角(白抜き)はRGD配列を示す。

図3は、新規PLA₁と、該新規PLA₁に相同性を有するリパーゼのアミノ酸配列を比較するマルチプルアラインメント図である。

図4は、リパーゼファミリーの構造の模式図(図4A)およびPLA₁/リパ

6

一ゼファミリーの系統樹を示す図（図4B）である。

図5は、新規PLA₁組換え型蛋白質の昆虫細胞における発現をウエスタンブロットリング法により確認した図である。図5Aは発現させたコンストラクトの模式図であり、図5Bはウエスタンブロットリングの結果を示す図である。

- 5 図6は、新規PLA₁のヘパリンカラムを用いた精製の結果を示す図である。図6Aはヘパリンカラムによる分画の結果を、図6Bは各画分中の新規PLA₁をウエスタンブロットリング法により確認した結果を示す。

- 図7は、新規PLA₁（図7A）とEDG7（図7B）のmRNAの組織分布を示す図である。図7Cは、内部標準プローブとして用いた常発現性遺伝子であるグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ（G3PDH）の発現を示す。

図8は、卵巣癌細胞およびヒト血小板における新規PLA₁蛋白質の発現を示す図である。

- 図9は、新規PLA₁の作用を検討するための、新規PLA₁発現細胞とFura2を取り込ませたLPA受容体EDG7発現細胞とを用いるバイオアッセイシステムを説明する図である。

図10（a～f）は、新規PLA₁を発現させたSf9が、LPA受容体EDG7を発現させたSf9の細胞内Ca²⁺濃度を上昇させることを示す図である。

図11（A～F）は、新規PLA₁が媒介するLPA産生におけるPLDの関与を示す図である。

10

発明を実施するための最良の形態

（新規PLA₁）

- 本発明において提供される新規PLA₁は、cDNAライブラリーから、新規なアミノ酸配列を有する物質としてそのcDNAが取得されたものである。そして、本発明から成る新規PLA₁は、ヒトの肺、腎臓、脾臓、前立腺、睾丸、卵巣、結腸において、その存在がノザンブロットリング法によって確認された。本発明からなる新規PLA₁の性質は以下である。リン脂質、特にホスファチジン

15

酸 (P A) に作用して L P A を生成する。基質特異性として、P A に対して高い特異的活性をもつ。リパーゼファミリーに保存されるコンセンサス配列および触媒トライアドならびにリッドと考えられるアミノ酸を有する。また、既知 P L A₁ 類との相同性は約 40 % 未満である。

5

(ポリペプチドまたはペプチド)

本発明の新規 P L A₁ のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 1 に記載のポリペプチドである。さらに本発明のポリペプチドまたはペプチドは、該配列表の配列番号 1 に記載のポリペプチドの少なくとも一部分を含有するポリペプチドまたは
0 ペプチドから選択される。その選択されるポリペプチドまたはペプチドは、配列表の配列番号 1 に記載のポリペプチドと、アミノ酸配列上で約 40 % 以上、好ましくは約 70 % 以上、より好ましくは約 80 % 以上、さらに好ましくは約 90 %、特に好ましくは約 95 % 以上の相同性を有する。この相同性をもつポリペプチドまたはペプチドの選択は、リン脂質、特にホスファチジン酸を分解し得る活性お
5 よび／またはホスファチジン酸に対する基質特異性の存在を指標にして可能である。上記分解活性は公知の方法、例えば、放射性同位体 (R I) 標識基質、蛍光基質、もしくは発色基質を用いた方法、または実施例に記載の方法で測定できる
(J. Biochem, 103, 442-447, 1988) (J. Biochem., 117, 1280-1287, 1995) (J. Biochem., 101, 53-61, 1987) (J. Biol. Chem., 235, 2595-2599, 1960) (J. Biol. Chem., 272, 2192-2198, 1997)。
10

アミノ酸配列の相同性を決定する技術は、自体公知であり、例えばアミノ酸配列を直接決定する方法、c D N A の塩基配列を決定後これにコードされるアミノ
15 酸配列を推定する方法等が挙げられる。

本発明のポリペプチドまたはペプチドは、配列表の配列番号 1 に記載のポリペプチドの部分配列を有するポリペプチドまたはペプチドを包含し、これらは例え

ば試薬、標準物質、または免疫原として利用できる。その最小単位としては8個以上のアミノ酸、好ましくは10個以上のアミノ酸、より好ましくは12個以上、さらに好ましくは15個以上の連続するアミノ酸で構成されるアミノ酸配列からなり、好ましくは免疫学的に同定し得るポリペプチドまたはペプチドを本発明の

5 対象とする。これらのペプチドは、試薬もしくは標準物質、または後述するように新規P L A₁に特異的な抗体を作製するための抗原として単独またはキャリア（例えば、キーホールリンペットヘモシアニンまたは卵白アルブミン等）と結合して使用できるが、これらのように別種の蛋白質または物質を結合したものも本発明の範囲に包含される。

- 10 さらに、このように特定されたポリペプチドまたはペプチドを基にして、リン脂質、特にホスファチジン酸を分解し得る活性および／またはホスファチジン酸に対する基質特異性の存在を指標とすることにより、1以上、例えば1～100個、好ましくは1～30個、より好ましくは1～20個、さらに好ましくは1～10個、特に好ましくは1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加あるいは挿入
- 15 といった変異を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはペプチドも提供される。欠失、置換、付加あるいは挿入の手段は自体公知であり、例えば、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法またはポリメラーゼ連鎖増幅法（PCR）を単独または適宜組み合わせ、例えばサムブルック等編「モレキュラークローニング、ア ラボラトリーマニュアル 第2版」コール
- 20 ドスプリングハーバーラボラトリー、1989、村松正實編「ラボマニュアル遺伝子工学」丸善株式会社、1988、エールリッヒ、H E．編「PCRテクノロジー、DNA増幅の原理と応用」ストックトンプレス、1989等の成書に記載の方法に準じて、あるいはそれらの方法を改変して実施することができ、例えばUlmerの技術（Science, 219, 666, 1983）を利用することが
- 25 できる。

上記のような変異の導入において、当該蛋白質の基本的な性質（物性、活性、または免疫学的活性等）を変化させないという観点からは、例えば、同族アミノ

酸（極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸、芳香族アミノ酸等）の間での相互置換は容易に想定される。後述するように、リパーゼファミリーのコンセンサス配列およびリ
5 ッド領域は活性の発現または調節に重要と考えられ、これらを含む領域、特に触媒トライアドを含むコンセンサス配列は一次配列上および／または立体構造
上保持されていることがP L A₁活性、特にP A－P L A₁活性を維持するためには好ましい。また、本発明のポリペプチドまたはペプチドは、糖鎖の有無に拘わ
10 らず本発明の範囲に包含されるが、糖鎖が活性に影響する可能性もあるため、少なくとも1つのグリコシレーションサイトは保持されていることが好ましい。

10 本発明においては、配列表の配列番号1のアミノ酸配列で示されるポリペプチドと同様のP L A₁活性を有するポリペプチドまたはその最小活性単位（領域もしくはドメイン）も提供されるが、それら以外にも、活性の強度または基質特異性を変更したポリペプチドが提供される。これらは、例えばP L A₁活性様物質
もしくはP L A₁拮抗物質として、またはP L A₁活性を調節する物質のスクリー
15 ニング等において有用である。なお、ヒト以外の動物種の相同遺伝子産物も当然本発明の範囲に包含される。

さらに、本発明のポリペプチド等の検出もしくは精製を容易にするために、または別の機能を付加するために、N末端側やC末端側に別の蛋白質、例えばアルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、I g G等の免疫グロブリンF c断
10 片またはF L A G－t a g等のペプチドを直接またはリンカーペプチド等を介して間接的に遺伝子工学的手法等を用いて付加することは当業者には容易であり、これらの別の物質を結合したポリペプチド等も本発明の範囲に包含される。

（ポリヌクレオチド）

15 一つの態様において、本発明のポリヌクレオチドおよびその相補鎖は、本発明のポリペプチドまたはペプチドのアミノ酸配列、例えば配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドおよび該ポリヌクレオチドに対

する相補鎖を意味する。これらは例えば上記新規P L A₁の製造に有用な遺伝子情報を提供するものであり、あるいは核酸に関する試薬または標準品としても利用できる。好ましいポリヌクレオチドを示す配列表の配列番号2において、塩基番号89のA (adenine) から塩基番号1441のG (guanine)

5 まだがコーディング領域と推定される。また、アミノ酸配列のアミノ酸番号1のM (Met) からアミノ酸番号19のE (Glu) までをコードしているatg ~ gaaはシグナル配列をコードしているものと推定される。なお、本発明の新規P L A₁遺伝子の塩基配列に、ヒト個体間における多型の存在が認められた。その中の一例では、配列表の配列番号2に記載の塩基配列の塩基番号1088の
10 G (guanine) がT (thymine) に置換され、結果としてアミノ酸番号334のD (Asp) がY (Tyr) に置換されており、別の例では、配列表の配列番号2に記載の塩基配列の塩基番号1204のA (adenine) がG (guanine) に置換され、この例においてはアミノ酸置換は無いと考えられた。

15 別の態様において本発明は、本発明のポリペプチドまたはペプチドのアミノ酸配列、例えば配列表の配列番号1のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド、好ましくは配列表の配列番号2の塩基配列で示されるポリヌクレオチドまたはその相補鎖の対応する領域にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。ハイブリダイゼーションの条件は、例えばサムブルック
20 等編 [モレキュラークローニング, ア ラボラトリーマニュアル 第2版] コールドスプリングハーバーラボラトリー, (1989) 等に従うことができる。これらのポリヌクレオチドは目的のポリヌクレオチド、特に配列表の配列番号2の塩基配列で示されるポリヌクレオチドまたはその相補鎖にハイブリダイズするものであれば必ずしも相補的配列でなくともよい。例えば、配列表の配列番号2の塩
25 基配列またはその相補配列に対する相同性において、少なくとも約40%、例えば、約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上である。また本発明のポリヌクレオチドは、指定さ

れた塩基配列の領域に対応する連続する10個以上のヌクレオチド、好ましくは15個以上、より好ましくは20個以上の配列からなるポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチドおよびそれらの相補鎖を包含する。

- これらのポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチド等の製造において、新規
- 5 P L A₁をコードする核酸、例えば、その遺伝子、もしくはm R N A検出のためのプローブもしくはプライマーとして、または遺伝子発現を調節するためのアンチセンスオリゴヌクレオチド等として有用である。その意味で、本発明のポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドは翻訳領域のみでなく、非翻訳領域に対応するものも包含する。例えば、アンチセンスによって新規P L A₁の発現を特異
- 10 的に阻害するためには、リパーゼファミリーで保存されているコンセンサス配列領域以外の新規P L A₁に固有な領域の塩基配列を用いることが想定される。一方、保存配列を用いることにより新規P L A₁を含む複数のリパーゼの発現を同時に抑制することも可能と考えられる。ここで、新規P L A₁または同様の活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列の決定は、例えば公知の蛋白質発現
- 5 系を利用して発現蛋白質の確認を行い、その生理活性特にホスファチジン酸を分解する活性を指標にして選別することにより行うことができる。無細胞蛋白質発現系を利用する場合は、例えば胚芽、家兎網状赤血球等由来のリボソーム系の技術を利用できる (N a t u r e、179、160~161、1957)。

10 (形質転換体)

- 上記のような無細胞蛋白質発現系以外にも、本発明は、大腸菌、酵母、枯草菌、昆虫細胞、動物細胞等の自体公知の宿主を利用した遺伝子組換え技術によっても、本発明からなる新規P L A₁およびその由来物からなるペプチドおよびポリペ
- 15 チドは提供可能である。本発明の具体例においては、昆虫細胞を利用したが、無論これに限定されるものではない (日本国特許第2129487号および第2644447号：組み替えバキュウロウィルス発現ベクターの製法とポリペプチドの合成)。なお、本発明の新規P L A₁遺伝子がコードするP L A₁は糖蛋白質で

あるため、ポリペプチドまたはペプチドに糖鎖を付加し得る宿主である動物細胞等の宿主を用いることが好ましい。

- 形質転換は、自体公知の手段が応用され、例えばレプリコンとして、プラスミド、染色体、ウイルス等を利用して宿主の形質転換が行われる。より好ましい系
- 5 としては、遺伝子の安定性を考慮するならば、染色体内へのインテグレート法であるが、簡便には核外遺伝子を利用した自律複製系の利用である。ベクターは、選択した宿主の種類により選別され、発現目的の遺伝子配列と複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子配列とを構成要素とする。組合せは原核細胞、真核細胞によって分別され、プロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、
- 10 シグナル配列、エンハンサー等を自体公知の方法によって組合せて利用できる。本発明の具体例においては、バキュロウイルス系を利用したが、無論これに限定されるものではない。

- 形質転換体は、自体公知の各宿主の培養条件に最適な条件を選択して培養される。培養は、発現産生される新規P L A₁およびその由来物からなるペプチドお
- 15 よびポリペプチドの酵素活性、特にホスファチジン酸を分解する酵素活性を指標にして行ってもよいが、培地中の形質転換体量を指標にして継代培養またはバッチにより生産してもよい。

(新規P L A₁およびその由来物回収)

- 20 培地からの新規P L A₁およびその由来物からなるペプチドおよびポリペプチドの回収は、ホスファチジン酸を分解する酵素活性を指標にして、分子篩、イオンカラムクロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等を組合せるか、溶解度差にもとづく硫酸、アルコール等の分画手段によっても精製回収できる。好ましくは、アミノ酸配列の情報に基づき、該アミノ酸配列に対する抗体を作成
- 25 し、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体によって、特異的に吸着回収する方法を用いる。簡便には、ヘパリンを利用したアフィニティクロマトグラフィーが利用できる。

(抗体)

抗体は、本発明の新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドの抗原決定基を選別し、作製する。抗原は新規 P L A₁ またはその断片

- 5 でもよく、少なくとも 8 個、好ましくは少なくとも 10 個、より好ましくは少なくとも 12 個、さらに好ましくは 15 個以上のアミノ酸で構成される。新規 P L A₁ に特異的な抗体を作製するためには、リパーゼファミリーのコンセンサス配列領域以外の新規 P L A₁ に固有な配列からなる領域を用いることが好ましい。このアミノ酸配列は、必ずしも配列表の配列番号 1 と相同である必要はなく、蛋白質の立体構造上の外部への露出部位が好ましく、露出部位が不連続部位であれば、該露出部位について連続的なアミノ酸配列であることも有効である。抗体は、免疫学的に新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドを結合または認識する限り特に限定されない。この結合または認識の有無は、公知の抗原抗体結合反応によって決定される。

- 5 抗体を産生するためには、本発明の新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドを、単独または担体に結合して、アジュバントの存在または非存在下で、動物に対して体液性応答および／または細胞性応答等の免疫誘導をおこなうことによって行われる。担体は、自身が宿主に対して有害作用をおこさなければ、特に限定されず例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミン
- 10 等が例示される。免疫される動物は、マウス、ラット、兎、やぎ、馬等が好適に用いられる。ポリクローナル抗体は、自体公知の血清からの抗体回収法によって取得される。好ましい手段としては、免疫アフィニティクロマトグラフィー法である。

- モノクローナル抗体を生産するためには、上記の免疫手段が施された動物から
- 15 抗体産生細胞（例えば、脾臓またはリンパ節由来）を回収し、自体公知の永久増殖性細胞（例えば、P 3 X 6 3 A g 8 株等の骨髓腫細胞株等）との融合によりハイブリドーマを作製する。これをさらにクローン化した後、本発明の P L A₁ を

特異的に認識する抗体を産生しているハイブリドーマを選別し、該ハイブリドーマの培養液から抗体を回収する。

- PLA₁活性を抑制し得るポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、直接本発明からなる新規PLA₁に結合し、その活性を制御することができ、リン脂質特にPAからのLPA産生系の制御を容易に行うことができる。そのため、LPAが関連する各種悪益的疾患の治療および／または予防のために有用である。

(化合物の同定・スクリーニング方法)

- かくして調製された新規PLA₁およびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチド、これらをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖、これらのアミノ酸配列および塩基配列の情報に基づき形質転換させた細胞、またはこれらを用いる蛋白質合成系並びに新規PLA₁およびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドを免疫学的に認識する抗体は、単独または複数を組合せることによって、新規PLA₁およびその由来物からなるペプチドおよびポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する活性の調節物質または調節剤、例えば活性阻害剤または活性賦活剤の同定方法またはスクリーニング方法に有効な手段を提供する。例えば、ペプチドまたはポリペプチドの立体構造に基づくドラッグデザインによる拮抗剤の選別、蛋白質合成系を利用した遺伝子レベルでの発現調節剤の選別、抗体を利用した抗体認識物質の選別等が、自体公知の医薬品スクリーニングシステムにおいて、利用可能である。ここで上記の調節とは、阻害、拮抗、活性化、活性促進、活性賦活等を含む。

- また、本発明の新規PLA₁およびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドまたは本発明のポリヌクレオチドもしくは形質転換体は、スクリーニング候補の化合物とこれらペプチドまたはポリペプチド等との間の相互作用を可能にする条件を選別し、この相互作用の有無を検出することのできるシグナル（マーカー）を使用する系を導入し、このシグナル（マーカー）の存在もしくは不存在、またはシグナル量の変化を検出することにより、本発明の新規PLA₁およびそ

の由来物からなるペプチドおよびポリペプチドの活性を賦活もしくは阻害する化合物、または本発明のポリヌクレオチドの発現を阻害もしくは促進する化合物を同定することができる。シグナル（マーカー）を使用する系としては、本発明のポリペプチドの活性、例えば、P A等の基質を分解する活性を測定する系または

5 ポリヌクレオチドの発現量を測定する系が含まれ、具体的には実施例に例示されている。これらは公知の方法を応用してもよい。

また本発明の新規P L A₁またはその由来物からなるポリペプチドを発現させた形質転換体と、該形質転換体中で発現される新規P L A₁またはその由来物からなるポリペプチドがホスファチジン酸に作用することにより生産されるリゾホ

10 スファチジン酸に対する受容体を発現させた別の形質転換体とを用い、化合物と前記ポリペプチドまたはこれら形質転換体の相互作用を可能にする条件下で、前記ポリペプチドまたはこれら形質転換体とスクリーニングすべき化合物とを接触させて、化合物と形質転換体との相互作用により生じるシグナルの存在または不

15 存在またはその変化を検出することにより、新規P L A₁およびその由来物からなるポリペプチドまたは本発明のポリヌクレオチドの活性または生理学的作用を阻害もしくは活性化する化合物を同定することができる。上記形質転換体としては、例えば本発明の新規P L A₁またはその由来物からなるポリペプチドを発現させたS f 9細胞と、L P A受容体E D G 7を発現させたS f 9細胞との組み合わせが挙げられるが、これに限定されない。また、本発明の新規P L A₁および

20 その由来物からなるポリペプチドの作用を検出するためのシグナルとしては、例えばL P A受容体E D G 7発現細胞にL P Aが結合することにより上昇する細胞内カルシウムを検出すればよい。細胞内カルシウムの検出はF u r a 2等を用いる自体公知の測定法を応用することができる。なお、本発明のポリペプチド等を他のリパーゼの相同物（すなわち、ポリペプチド等）またはL P Aに置き換えた

25 対照系における反応と比較することにより、化合物の作用の特異性を確認することができる。また、各形質転換体は、対応する遺伝子の発現が確認された細胞株などに置き換えてもよい。

(化合物、医薬組成物)

このようにして同定された化合物は、新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドおよびポリペプチドに関する、活性もしくは作用の阻害剤、拮抗剤、活性化剤、促進剤、または賦活剤の候補化合物として、利用可能である。また、遺伝子レベルでの新規 P L A₁ およびその由来物に対する発現阻害剤、発現拮抗剤、発現活性化剤、発現促進剤、発現賦活剤の候補化合物としても利用可能である。その効果は、L P A に由来する各種悪症的症状の予防および／または治療を期待できる。

0 かくして選別された候補化合物は、生物学的有用性と毒性のバランスを考慮して選別することによって、医薬組成物として調製可能である。また本発明からなる新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチド、これらをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖、これらの塩基配列を含むベクター並びに、新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドを免疫学的に認識する抗体は、それ自体を、診断マーカーもしくは試薬等の疾病診断手段として、または新規 P L A₁ の発現、活性、もしくは作用を阻害、拮抗、活性化、促進、賦活する機能を利用した治療薬等の医薬手段として使用し得る。なお、製剤化にあたっては、ペプチドまたはポリペプチド、蛋白質、ポリヌクレオチド、抗体等各対象に応じた自体公知の製剤化手段を導入すればよい。

10 上記医薬組成物は、本発明の新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、形質転換体、抗体、および上記本発明の化合物を利用して製造することが可能である。上記医薬組成物は、P L A₁ 特に新規 P L A₁ に関連する疾患の治療に有用である。

15 診断手段としては、本発明の新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドの発現または活性に関連する疾患の診断手段として有用であり、診断は例えば当該ペプチドをコードしている核酸配列との相互作用や反応性を利用して、相応する核酸配列の存在量を決定すること、および／または当該ペ

プチドについて個体中の生体内分布を決定すること、および／または当該ペプチドの存在、個体由来の試料中の存在量または活性量を決定すること等によって行われる。すなわち、新規PLA₁を診断マーカーとして検定するのである。その測定法は、自体公知の抗原抗体反応系、酵素反応系、PCR反応系等を利用すればよい。さらに、前述したように、個体による多型の存在が認められるので、公知の方法により単一ヌクレオチド多型（SNP）を検出することも有用な診断手段である。

実施例

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

（遺伝子の単離）

ホスファチジルセリンを特異的に加水分解するラットホスホリパーゼA₁（PS-PLA₁）（J. Biol. Chem., 272, (4), 2192-2198, 1997）のアミノ酸配列をプローブとして、dbEST（database of Expressed Sequence Tags）に対して、ホモロジーサーチ（tblastn search）を実施した。その結果、未知の核酸配列で相同性スコアの比較的高かった、受託番号（accession no.）AA149791、AA102322の2種類のEST配列を得た。

次に、受託番号（accession no.）AA102322の核酸配列をプローブとして、dbESTに対してホモロジーサーチ（blastn search）を実施した。

その結果、受託番号（accession no.）AA367368の配列と、AA149791の配列とが重なる塩基配列領域を有することが明らかとなった（図1）。これらの配列を、重複する領域で並べたところ、AA149791（翻訳開始コドンと予想されるメチオニン残基を含む配列）、AA102322（AA149791と重なりを有する配列）、AA367368（AA102322と大

幅に重なり、触媒トライアド等を含む配列)の順番で配置することが可能であることが判明した。次に、これらの配列を並べ、その特色を解析した。P S - P L A₁や、リパーゼに特色的な、活性トライアドのアミノ酸残基や立体構造的に活性ポケット近傍にあるリッドと呼ばれるループ構造領域 (B. B. A., 1376, 417-432, 1998) (Biochemistry, 32, 4702-4707, 1993) (蛋白質 核酸 酵素, 44, 1038-1042, 1999) が存在することが予測され、その配列上の特色から新規なホスホリパーゼ A₁ である可能性が推測された。

10 (新規配列のクローニング)

実際に、上記解析で予測された新規 P L A₁ 遺伝子配列を有する c D N A をクローニングする目的で、開始メチオニンコドンをもつと考えられたヒト大腸由来の部分的な c D N A 配列 (accession no. AA149791) を含むクローンを、American Type Culture Collection (ATCC) から入手した。

該クローンの核酸配列を確認したところ、全長 c D N A を含む可能性が示唆された。これがアーティファクトでないことを確認するため、該配列をもとに、P C R プライマーとして、配列表の配列番号 3 の 5' - T G C G A A G T A A A T C A T T C T T G T G A A - 3' (フォワードプライマー配列) および配列表の配列番号 4 の 5' - T G T G A C A T C C A T A G G A C G C T A C T G - 3' (リバースプライマー配列) の塩基配列のオリゴヌクレオチドを作製し、ヒトの大腸、肺、腎臓由来の R N A (Clontech) を用いて、R T - P C R した。増幅された遺伝子断片 (約 1.5 k b p) を、プラスミド p B l u e S c r i p t I I S K (Stratagene) をクローニング用のベクターとし、このマルチクローニングサイト E c o R I / X h o I にクローン化後、塩基配列を決定した。配列は、p B l u e S c r i p t I I S K のマルチクローニングサイトのプライマーを使用し、E c o R I、P s t I、H i n d I I I、X h o I の

4 個所の制限サイトを活用しながら、シーケンスを行った。次に、この配列をもとに、プライマーオリゴマーを設計し、プライマーウオーキングの手法を用いて新規 PLA₁ と考えられた配列表の配列番号 2 の塩基配列を最終的に確認した (図 2)。また、RT-PCR 産物のダイレクトシーケンシングによっても配列

5 を確認した。これらにより、塩基配列の 2 カ所に個体による多型を認めた。なお、該塩基配列を含有するプラスミドを含む大腸菌は受託番号 FERM P-17428 として工業技術院生命工学工業技術研究所に 1999 年 6 月 22 日付で寄託されている。さらに、2000 年 6 月 15 日付で国際寄託に移管された (FERM BP-7188)。

10 この配列表の配列番号 2 に記載の cDNA は、配列表の配列番号 1 に記載の 451 アミノ酸残基からなる蛋白質を暗号化可能な、1353 塩基からなるオープンリーディングフレームを含み、N 末端領域に、シグナル配列と予想される領域を有していた。配列的な特色としては、アスパラギングリコシレーションサイトのモチーフである N-{P}-[ST]-{P}. を 4 個所 (N(Asn)50-C(Cys)53、N(Asn)58-A(Ala)61、N(Asn)66-K(Lys)69、N(Asn)357-E(Glu)360)) 持ち、細胞結合領域のモチーフとして知られる RGD 配列を 1 個所 (R(Arg)344-D(Asp)346) 含み、システイン残基を 13 個有していた。

10 (既存蛋白質との相同性)

塩基配列の翻訳によって予想されるアミノ酸配列を用いて、既存のデータベース (Genbank) に対して tblastn を用いたホモロジーサーチを実施した。その結果、図 3 に示すように、本発明の新規リパーゼ (新規 PLA₁) (colon lipase) はヒト PS-PLA₁ (hPS-PLA₁)、膵臓型リ

15 パーゼ (human pancreatic lipase)、肝臓型リパーゼ (hepatic lipase)、リポプロテインリパーゼ (lipoprotein lipase)、膵臓リパーゼ関連蛋白質 1 (plrp1; pancreat

ic lipase related protein 1) および 2 (plrp2; pancreatic lipase related protein 2) と有意な相同性を示した。その他、立体構造的にリパーゼと相同性が高い領域があるとされるピテロジェニンとの相同性も高かった。これらの相同性が高かった既知蛋白質配列のうちピテロジェニンを除く上記各蛋白質において、酵素活性トライアドと予測されるアミノ酸残基 (S (Ser) 154、D (Asp) 178、H (His) 248) がすべて保存されているのが確認されたので、これらの配列を GENETYX Multiple Alignment モジュール (ソフトウェア開発株式会社) を用いて、マルチプルアラインメント表を作成した。

その結果、配列表の配列番号 1 のアミノ酸配列においては、図 2 に示すように、リパーゼファミリーに保存されているコンセンサス配列 GXSXG (G (Gly) 152 - G (Gly) 156)、ITGLD (I (Ile) 174 - D (Asp) 178) および CXH (C (Cys) 246 - H (His) 248) (X は任意のアミノ酸を示す) が存在し、これらには触媒活性トライアドと考えられるアミノ酸残基が全て含まれていることが判明した。また、立体構造的に活性トライアドが存在するポケットの近傍に存在し、リパーゼの活性発現を調節しているリッドと呼ばれるループ構造 (P (Pro) 234 - K (Lys) 245) が、PS-PLA₁ のそれと同じ残基数すなわち 12 個存在することが判明した。通常、PS-PLA₁ 以外のリパーゼ群は、リッド構造のアミノ酸残基数が長く、コリパーゼと呼ばれる蛋白質の因子が結合することによって活性が発現されることが知られている (B. B. A., 1376, 417-432, 1998) (Biochemistry, 32, 4702-4707, 1993) (蛋白質 核酸 酵素, 44, 1038-1042, 1999) が、比較的リッドが短い PS-PLA₁ については、コリパーゼの必要性は、現在まで明らかにされていない。従って、今回得た塩基配列から翻訳される蛋白質も、PS-PLA₁ に似た機構で活性を発現する可能性も予測される。図 6 A に、新規 PLA₁ と他の PLA₁ ファミリー

との構造を比較して模式図で示した。

- 次に、GENETYX Evolutional tree (UPGMA method) モジュール (ソフトウェア開発株式会社) によって、PLA₁ リパーゼファミリーについて配列の進化的な系統樹を予測した。その結果、新規配列は、PS-PLA₁ と最も進化的に近い配列であることが推測された (図6B)。
- 5 以上のことから、新規配列が翻訳された蛋白質は、リパーゼ群に近く、特にホスホリパーゼに近縁な新規リパーゼであることが推測された。

(新規 PLA₁ の発現)

- 0 完全長 cDNA を上述の pBlueScript II SK (−) から、EcoRI/XhoI で切り出し作製した。プラスミド pF_{AST}B_{AC}1 (ライフテックオリエンタル社) 中のマルチクローニングサイトに EcoRI/XhoI の制限酵素サイトで cDNA を組み込んだ。C 末端側に FLAG-tag (Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys) (Biotechnology, 6, 1205-1210, 1988) をつけたものに関しては、
- 5 終止コドンを取り除き代わりに、配列表の配列番号 6 に記載の FLAG-tag をコードする核酸配列末端に HindIII 部位を持った合成オリゴクレオチド (プライマー 2) を作製し、また、配列表の配列番号 5 に記載の開始メチオニンの最初に BamHI を導入したオリゴヌクレオチド (プライマー 1) を作製し、
- 10 上述の pBlueScript II SK (−) をテンプレートに用い PCR を行い、cDNA を増幅した。

プライマー 1 : 5' - CGC GGA TCC ATG TTG AGA TT
C TAC TTA TTC ATC - 3' (配列表の配列番号 5)

- 15 プライマー 2 : 5' - CCG GAA TTC TTA CTT GTC AT
C GTC GTC CTT GTA GTC CAA CTG CAA CT
C TGG GCA AAG AAT - 3' (配列表の配列番号 6)

プラスミド $pF_{AST}B_{AC}1$ 中のマルチクローニングサイトの、 $BamHI/EcoRI$ の制限酵素サイトに $cDNA$ を組み込んだ後、大腸菌 $JM109$ に、構築した $pF_{AST}B_{AC}1$ をトランスフェクションし、ポジティブクローンを選択後、
5 該ポジティブクローンの培養を行いプラスミドを回収した。このプラスミドを、 $DH10BAC^{TM}$ コンピテントセル ($GIBCO BRL$) にトランスフェクションし、組換え $Bacmid$ を回収した。得られた $Bacmid$ は、 $CellFECTIN^{TM}$ ($pF_{AST}B_{AC}1$) とともに $Sf9$ 細胞 (夜盗蛾 $Spodoptera frugiperda$ さなぎ卵巣組織由来) にトランスフェクションした。
10 その結果、組換え型バキュロウイルス ($Baculovirus$) が培養上清中に回収された。

次に、蛋白質の発現を確認する目的で、回収したバキュロウイルスを $Sf9$ 昆虫細胞に感染させ $27^{\circ}C$ 96時間培養した。培養した感染 $Sf9$ 細胞は細胞画分と上清とに遠心分離し、それぞれから抽出した蛋白質をサンプルとして $SDS-PAGE$ を行い、ウエスタンブロッティングを $FLAG-tag$ に対する抗体を用いて実施したところ、新規 PLA_1 は培養上清中にも少量分泌されるものの、
5 その殆どが細胞画分より回収され、予想される新規 PLA_1 の分子量約 $50kDa$ 前後に複数のバンドが認められた (図5)。この複数のバンドは新規 PLA_1 の糖鎖修飾によるものと考えられる。新規 PLA_1 は、そのアミノ酸配列の N 末端
10 にシグナルペプチド様の配列を有するものの、細胞結合性 ($cell-associated$) の酵素と考えられる。以下、細胞結合性とは、細胞膜もしくは細胞内に存在する、または細胞膜に会合して存在することを意味する。上記手法により、新規 PLA_1 は昆虫細胞などを用いることによって細胞に発現させ得ることを確認した。なお、以下に記載する新規 PLA_1 の精製においては、精製工程
15 を簡便にするため、少量の新規 PLA_1 が含まれる培養上清を用いた。

(新規 PLA_1 の精製)

組換え型バキュロウイルス (Baculovirus) (日本国特許第 2129487 号および第 2644447 号: 組換えバキュロウイルス発現ベクターの製法とポリペプチドの合成) 感染培養上清 500 ml を回収し、 $10,000 \times g$ 、20 分、 4°C の遠心にて細胞断片を除き、さらに、フィルターをかけることにより (Falcon、ポアサイズ $0.45 \mu\text{m}$) 培養上清中のゴミを除去した。FPLC system (Amersham-Pharmacia) を用い、上述した培養上清を、ヘパリンカラム (Hi-trap Heparin, Amersham-Pharmacia, 5 ml) に付し最終的に、 10 mM Tris-HCl ($\text{pH} 7.4$) 存在下、 100 mM から 1500 mM の NaCl で濃度勾配溶出を行った。溶出の分画は、 2.5 ml ずつ行い、全部で 20 フラクション分画した。新規 PLA_1 は約 1 M 前後の比較的高濃度の NaCl で溶出され、ヘパリンに対して高親和性を示した (図 6 A)。次に分画した各画分の一部を SDS-PAGE に付し、抗 FLAG-tag 抗体によってウエスタンブロッティングし、画分番号 10 ~ 16 に、分子量約 50 kDa の新規 PLA_1 が回収されていることを確認した (図 6 B)。

同様に対照として、野生型バキュロウイルス (wild type baculovirus) を感染させた培養上清を、上述のようにヘパリンカラムに付し、 NaCl の濃度勾配溶出画分を調製したが、この画分には抗 FLAG-tag 抗体で検出される分子は確認されなかった。

(抗体の調製)

新規 PLA_1 の C 末端の 18 個のアミノ酸配列 [配列表の配列番号 1 のアミノ酸番号 434 (Met) から 451 (Leu) まで] を有するペプチドを KLH (keyhole limpet hemocyanin) と結合させたものを抗原として用い、フロイントの完全アジュバントと共にラット (WYK 種) の後足蹠へ投与して免疫した。免疫したラットのリンパ節細胞をマウスのミエローマ細胞 (PAI) と融合させて融合細胞を得、その中から抗体分泌細胞を、ELI

S A、細胞蛍光法、およびウエスタンブロッティングによるスクリーニングで常法に従い選別した。新規P L A₁に対する抗体は、該選別された融合細胞を常法に従って培養して得た。

5 (発現組織の確認)

新規P L A₁の発現組織を調べる目的で、ヒト正常組織に対してノザンブロッティングを行った。オープンリーディングフレーム内のc D N A断片である約0.7 k b pのP C R断片をプローブとして用いた。すなわち、P C Rプライマーとして、配列表の配列番号7に記載のC T G C G C A C A A A C C A T C A A C T
10 C C T C (フォワードプライマー配列) および配列表の配列番号8に記載のA G G G A C A G G A C T C T T T T T G T G A C (リバープライマー配列) の塩基配列で示されるオリゴヌクレオチドを合成し、P C Rをおこなうことにより³²P標識プローブを調製した。ノザンブロッティングは、Human Multiple Tissue Northern Blot (Clontech) を用
15 いてユーザーマニュアル (P T 1 2 0 0 - 1、Clontech) に従って実施した。その結果、正常組織においては、肺、腎臓、脾臓、前立腺、睾丸、卵巣、結腸においてm R N Aの発現が認められた (図7 A)。

また、いくつかのヒト卵巣癌細胞株 (O v c a r - 3、O v c a r - 5、およびO v c a r - 8) においても、ノザンブロッティング法により新規P L A₁の
20 m R N Aが発現していることを見出した。さらに上記卵巣癌細胞株について、本発明の新規P L A₁ (s P A - P L A₁) に対する上記モノクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティング分析を行ったところ、分子量55 k D aと52 k D aの2つのバンドが検出され、新規P L A₁蛋白質がこれら細胞株 (O v c a r - 3、O v c a r - 5、およびO v c a r - 8) で発現されていることが明らか
25 になった (図8)。2つの異なった分子量のバンドは、新規P L A₁の糖鎖修飾の差異による。新規P L A₁は、その殆どが卵巣癌細胞株の細胞画分から回収され、細胞上清からは得られなかった。また、新規P L A₁はヒトの血小板においても

高い発現がみられた (図 8)。血小板においても 2 つのバンドが検出されたが、その分子量は卵巣癌細胞で認められたものより少し小さかった。

さらに、卵巣癌細胞株における新規 PLA₁ の細胞内局在性を、上記新規 PLA₁ モノクローナル抗体を用いて免疫蛍光法で調べた。まず、卵巣癌細胞株 (Ovcar-3、Ovcar-5、および Ovcar-8) を 5 % CO₂ 雰囲気下で 5 % の牛胎児血清 (FCS) を含む Dulbecco の修正イーグル培地 (DMEM) で培養した。カバーガラス上に増殖させた細胞は氷冷メタノールで固定し、10 % ヤギ血清でブロックした。これを新規 PLA₁ に対する抗体または抗カベオリン (caveolin) 1 抗体 (Santa Cruz Biotech h 社製) とインキュベーションし、続いて第 2 抗体であるラットまたはウサギの抗 Ig 抗体 (Alexa 488/green または Alexa 594/red を結合) とさらにインキュベーションし、新規 PLA₁ に対する抗体と抗カベオリン 1 抗体とにより二重染色した。新規 PLA₁ またはカベオリンが存在する細胞内領域は蛍光マイクロスコープ (Zeiss, Germany) により検出した。その結果、新規 PLA₁ は、細胞表面上の微小領域 (microdomain) に局在することが知られるカベオリン 1 と同じ領域に局在することが判明した。また、Ovcar-5 細胞では、新規 PLA₁ が斑点状分布を示した。

(基質特異性の検討)

上記の、組換え型バキュロウイルスを感染させた Sf9 細胞から精製した新規 PLA₁ を用いて、脂肪酸が [¹⁴C] で放射標識されたホスファチジン酸 (PA)、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルコリン (PC)、またはトリアシルグリセロール (TG) を基質とし、ホスホリパーゼ活性およびリパーゼ活性を測定した (J. Biol. Chem., 272, 2192-2198, 1997)。

ホスホリパーゼ活性 (PA、PS、PC) は、40 μM のそれぞれの基質を、100 mM Tris-HCl (pH 7.5)、4 mM CaCl₂ 存在下、酵素とともに 37 °C で 1 時間インキュベーションし、遊離した放射性同位体標識脂肪酸

をドール法により抽出し、放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。リパーゼ活性 (TG) は、 $40 \mu\text{M}$ の基質を 100 mM Tris-HCl (pH 7.5)、 4 mM CaCl_2 存在下、酵素とともに 37°C で 1 時間インキュベーションし、遊離した放射性同位体標識脂肪酸をドール法により抽出し、放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。その結果、新規 PLA_1 には、PA および PS を切断するホスホリパーゼ活性が検出された。TG を切断するリパーゼ活性、PC または PE に対するホスホリパーゼ活性に関しては有意な活性は検出されなかった。PA を切断するホスホリパーゼ活性は、野生型バキュロウイルス (wild type baculovirus) を感染させた Sf9 細胞培養上清から同様に精製した画分には検出されなかった。以上の検討により、新規 PLA_1 は、PA を加水分解し、細胞の分化および／または増殖を促進する成長因子であるリゾホスファチジン酸 (LPA) の生成過程に参与する可能性があることが示唆された。

5 (PS- PLA_1 との比較)

表 1 に、本発明の新規 PLA_1 と既知のヒト由来ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A_1 (PS- PLA_1) との性状を比較して示した。本発明の新規 PLA_1 は PS- PLA_1 と比較して、ヘパリンに対して高い親和性を示し、そのほとんどが細胞結合性の糖蛋白質であった。

表 1

	Lid	ヘパリン 親和性	臓器分布	細胞内分布	基質特異性
PS- PLA_1 (456 a.a.)	12 a.a.	低	様々な臓器 (inducible)	分泌性 細胞結合性	PS lysoPS
新規 PLA_1 (451 a.a.)	12 a.a.	高	様々な臓器	細胞結合性 分泌性	PA PS

(L P A受容体との関係)

本発明の新規P L A₁は、P Aに作用して加水分解し、2 -アシルL P Aを産生する。従って、新規P L A₁は、生体内での機能として、L P Aを生産してL P A受容体にリガンドとして供給している可能性がある。L P A受容体は、E D G 2、E D G 4、およびE D G 7が知られているが、中でもE D G 7は、不飽和脂肪酸を含むL P Aに対し強い反応性を示し、1 -a c y l -L P Aより2 -a c y l -L P Aに強く反応するユニークな受容体であり、そのリガンド特異性はE D G 2、E D G 4とは異なる (J . B i o l . C h e m . , 2 7 4 , p p 2 7 7 7 6 - 2 7 7 8 5 , 1 9 9 9)。E D G 7を介するシグナル伝達には何らかのP L A₁反応が関与することが予想されるので、新規P L A₁とE D G 7の生体組織における発現をノザンブロットティング法により調べたところ、両方のm R N A が膵臓、前立腺、精巣に共によく発現しており、比較的良く似た組織分布を示した (図 7 A、BおよびC)。また、上記したように、新規P L A₁の発現が認められた卵巣癌細胞株および血小板では、L P Aの存在も報告されている。

次に、新規P L A₁がP Aを加水分解してL P Aを産生し、E D G 7にリガンドとして供給する可能性について検討した。まず、部分精製した本発明の新規P L A₁をE D G 7発現細胞に添加したが細胞応答は観察されなかった。そこで、図9に示すバイオアッセイ系を用いて、L P Aが新規P L A₁によって生産され得るか検討をおこなった。バイオアッセイ系には、L P Aへの反応性を欠く昆虫細胞S f 9を使用した。S f 9細胞に、新規P L A₁を上記のバキュロウイルス系を用いて発現させた (以下、酵素側と呼ぶこともある)。また、L P A受容体であるE D G 7を、J . B i o l . C h e m . , 2 7 4 , p p 2 7 7 7 6 - 2 7 7 8 5 , 1 9 9 9 に記載の方法に準じてバキュロウイルス系を用いてS f 9細胞に発現させた (以下、受容体側と呼ぶこともある)。この系においては、新規P L A₁が十分に発現されてL P Aが産生されれば、L P A受容体を発現している細胞にL P Aが結合して細胞内シグナル伝達が惹起され、カルシウムイオン (C a²⁺) の細胞内濃度が上昇する。すなわち、新規P L A₁の i n v i t r oでのL P

A産生とその作用を、 Ca^{2+} の濃度変化を検出することにより、検討することができる。 Ca^{2+} 濃度変化の測定は、 Ca^{2+} 蛍光指示薬Fura-2を用いて行った。まず、LPA受容体を発現させたSf9細胞をSf9カルシウムアッセイ用栄養液（10mM CaCl_2 ，60mM KCl ，17mM MgCl_2 ，10
 5 mM NaCl ，10mM MES，4mM グルコース，110mM シュークロース，0.1%ウシ血清アルブミン）に 5×10^5 細胞/mlとなるように懸濁し、2 μM Fura2-AMを27°Cで1時間取り込ませた。その後、上記栄養液で2回洗浄後、上記栄養液中に 5×10^5 細胞/mlとなるように懸濁した。新規PLA₁を発現させたSf9細胞は、上記栄養液に 5×10^5 細胞/5
 10 0 μl となるように懸濁した。キュベット中に上記で調製したLPA受容体発現細胞を1ml加え、マイクロスターラーで攪拌しながら340nmおよび380nmの励起光をあて、それぞれの500nmでの蛍光強度とその比を、CAF-110型細胞内イオン測定装置（日本分光工業株式会社）により測定した。これに新規PLA₁発現細胞を50 μl 加えて同様に測定を行った。また、それぞれの測定時に、トリトン-X100を添加して全Fura2と細胞外 Ca^{2+} が結合した時の値と、EGTAを加えて全 Ca^{2+} がキレートされてFura2が解離した時の値を同様に測定した。上記各測定値を用いて、下記式により、細胞内カルシウム濃度を算出した。

$$[\text{Ca}^{2+}] \text{ (nM) } = 224 \times b / a \times (F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)$$

上記式において、224はFura2の解離定数、aはトリトンX-100を加えて全Fura2と細胞外 Ca^{2+} が結合した時の380nm励起光による蛍光強度、bはEGTAを加え全 Ca^{2+} がキレートされてFura2が解離した時の380nm励起光による蛍光強度、Fは340nm励起光による蛍光強度/380nm励起光による蛍光強度の比、F_{max}はトリトンX-100を加えて全Fura2と細胞外 Ca^{2+} が結合した時のF、F_{min}はEGTAを加え全 Ca^{2+} がキレートされてFura2が解離したときの

Fである。

その結果、EDG7を発現させたSF9細胞に、新規PLA₁発現細胞を加えると細胞内Ca²⁺濃度の上昇が観察された(図10a)。この現象は、受容体側(図10b)または酵素側(図10e)を野生型バキュロウイルスで感染させた細胞に変えた場合には観察されなかった。Fura2が受容体側細胞に取り込まれていることは、細胞内Ca²⁺ストアからCa²⁺を放出させるタプシガージンを用いて確認した(図10b)。また、このCa²⁺細胞内濃度の上昇は、LPA(100nMの1-o-oleoyl)により一時的にCa²⁺濃度を上昇(図10c)させた後では、新規PLA₁発現細胞を加えてもみられず、脱感作を受ける(図10d)ことが判った。このことは、観察されたCa²⁺の上昇が、EDG7によって媒介されていることが示唆する。このEDG7発現細胞の細胞内Ca²⁺濃度の上昇は、他のホスホリパーゼ[sPLA₂-IIA(secretory phospholipase type IIA)またはPS-PLA₁]を発現させた細胞では誘導できない(図10e)ことから、新規PLA₁に特異的な現象である。また新規PLA₁発現細胞の培養上清は、なんら検知できるCa²⁺反応を誘導せず(図10a)、生産されたLPAは殆ど細胞と会合していることが判明した。さらに、新規PLA₁の酵素活性中心であり、ほとんど全てのリパーゼ/PLA₁ファミリーで保存されているセリン残基〔配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列154(Ser)〕をアラニン残基に置換した新規PLA₁変異体発現細胞は、EDG7発現細胞のCa²⁺濃度の上昇を誘導しなかった(図10f)。以上のことから、新規PLA₁は細胞内で内在性のPAを基質として加水分解してLPAを産生し、LPA受容体であるEDG7を発現している細胞に作用していることが証明された。また、産生されたLPAは細胞膜中に存在していることが示唆された。かくして、新規PLA₁による細胞内LPA産生と、LPA受容体であるEDG7への細胞膜に存在するLPAの受け渡し機構が本発明により確認され、PLA₁ファミリーの生理的意義、およびその作用機序を明らかにする手がかり

を提供した。

(新規 PLA_1 が媒介する LPA 産生における PLD の関与)

膜リン脂質を PA に変換するホスホリパーゼ D (PLD) は、卵巣癌細胞による LPA 産生においても関与している。新規 PLA_1 による LPA 産生における PLD の役割を見出すために、プロテインキナーゼ $C\alpha$ を介して PLD_1 を活性化する PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)、および PLD の全てのアイソフォームを阻害する短鎖アルコール (short-chain alcohols) を使用した。新規 PLA_1 発現細胞と EDG 7 発現細胞は上記同様のものを用いた。まず、PMA 存在下で新規 PLA_1 発現細胞をインキュベーションし、EDG 7 発現細胞からのカルシウム放出を誘導し得るか検討した。図 11A および D に示すように、100 nM の PMA で細胞を 30 分間処理することにより、有意に新規 PLA_1 発現細胞の添加による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を促進した。また、PLD 活性を完全に阻害し得る濃度である 0.5% 1-ブタノール存在下では、新規 PLA_1 発現細胞の Ca^{2+} 濃度上昇の PMA 処理による促進は完全に阻害された (図 11B および E)。一方、0.5% 2-ブタノールは、何ら影響しなかった (図 13C および F)。2-ブタノールは、PLD を阻害しないことから、新規 PLA_1 による LPA 産生は Sf9 細胞においては PLD 依存的 (PLD-dependent) であるといえる。PMA、1-ブタノールまたは 2-ブタノール単独では、細胞内 Ca^{2+} 濃度に何ら影響しなかった。また、他のホスホリパーゼ、PS- PLA_1 または s PLA_2 -IIa を発現させた Sf9 細胞を PMA 処理しても、EDG 7 発現細胞において何ら検知できる Ca^{2+} 反応を誘導されなかった。すなわち、新規 PLA_1 は LPA (おそらく 2-acyl-1-lysophosphatidic acid) を PLD の活性化との協同作用により産生するものと結論付けた。

(アンチセンスオリゴの調製)

ヌクレオチド配列 G A A T A A G T A G A A T C T C A A C A T A T G G (配列番号 2 の塩基番号 85 の C (c y t o s i n e) ~ 109 の C (c y t o s i n e) までの開始コドンを含む領域に対する相補鎖) を有するホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドを株式会社サワディーテクノロジーに委託して合成した。

5

(全長アンチセンス (相補鎖) 発現ベクターの作製)

新規 P L A₁ をコードする DNA を含有するプラスミドである B l u e s c r i p t S K - P A - P L A 1 (上記実施例の新規配列のクローニングの項に記載したものと同一) を t e m p l a t e DNA にして P C R 法にて c D N A 断片を増幅し、制限酵素 B a m H I および N o t I で消化した。得られた約 1.5 k b p の DNA 断片を発現用ベクター p c D N A 3 の制限酵素 B a m H I - N o t I のサイトにライゲートし、全長のアンチセンス鎖 (相補鎖) を発現するベクターを作製した。

5 (P L A 1 発現抑制試験)

新規 P L A₁ を発現する細胞株 O v c a r - 3、O v c a r - 5、O v c a r - 8 に上記で調製したアンチセンスオリゴおよび全長アンチセンス発現ベクターを、トランスフェクション試薬 F u G e n e 6 (ロッシュ) を用いて使用説明書に従ってトランスフェクションした。対照として発現用ベクター p c D N A 3 自体を用いた。72 時間後に、細胞を回収し、通常の方法に従って、ウェスタンブロットティングを実施した。

10

産業上の利用の可能性

- 本発明は、 PLA_1 リパーゼファミリーに属する新規 PLA_1 を提供するものである。新規 PLA_1 はホスファチジン酸（PA）に対する基質特異性を有する細胞結合性の糖蛋白質であり、PAを加水分解してリゾホスファチジン酸（LPA）を産生させるものである。さらに本発明は、新規なPA特異的リパーゼ（ PLA_1 ）による細胞におけるLPA産生と、LPA受容体であるEDG7への細胞からのLPAの受け渡し機構の存在を見出したことにより、 PLA_1 ファミリーの生理的意義、LPA受容体のリガンドを産生する機構を解明する手がかりを提供するものであり、この知見を利用した新規医薬組成物、診療手段の提供は、リパーゼ関連の臨床ならびに基礎の医用領域において大きな有用性を提供する。

請 求 の 範 囲

1. 下記の群より選ばれるポリペプチド；

①配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列で示されるポリペプチド、

5 ②前記①のポリペプチドを含有するポリペプチド、

③前記①のポリペプチドと少なくとも約 70 % のアミノ酸配列上の相同性を有しかつホスファチジン酸を分解する活性を有するポリペプチド、および

④前記アミノ酸配列において 1 ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加あるいは挿入といった変異を有し、かつホスファチジン酸を分解する活性を有するポリペプチド。

2. 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の、少なくとも約 8 個の連続するアミノ酸配列を有するペプチド。

3. 請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載のポリペプチドまたはペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖。

4. 請求の範囲第 3 項に記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド。

5. 配列表の配列番号 2 に記載の塩基配列またはその相補的配列の、少なくとも約 15 個の連続する塩基配列で示されるポリヌクレオチド。

10 6. 請求の範囲第 3 項ないし第 5 項に記載の何れかのポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

7. 請求の範囲第 6 項に記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

8. 請求の範囲第 7 項に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載のポリペプチドまたはペプチドの製造方法。

9. 請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載のポリペプチドまたはペプチド

を免疫学的に認識する抗体。

10. ホスファチジン酸を分解する活性を抑制する、請求の範囲第9項に記載の抗体。

5 11. 請求の範囲第1項に記載のポリペプチドと相互作用してその活性を阻害もしくは活性化する化合物、および／または請求の範囲第3項もしくは第4項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物の同定方法であって、請求の範囲第1項または第2項に記載のポリペプチドもしくはペプチド、請求の範囲第3項ないし第5項に記載の何れかのポリヌクレオチド、請求の範囲第6項に記載のベクター、請求の範囲第7項に記載の形質転換体、請求の範囲第9項もしくは第10項に記載の抗体のうち、少なくとも何れか一つを用いることを特徴とする方法。

12. 請求の範囲第1項に記載のポリペプチドと相互作用してその活性を阻害もしくは活性化する化合物、または請求の範囲第3項もしくは第4
5 項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物の同定方法であって、化合物とポリペプチドまたはポリヌクレオチドとの間の相互作用を可能にする条件下で、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドとスクリーニングすべき化合物とを接触させて化合物の相互作用を評価し（かかる相互作用はポリペプチドまたはポリヌ
10 レオチドと化合物との相互作用に応答した検出可能シグナルを提供し得る第2の成分に関連したものである）、次いで、化合物とポリペプチドまたはポリヌクレオチドとの相互作用により生じるシグナルの存在または不存在またはその変化を検出することにより、化合物がポリペプチドまたはポリヌクレオチドと相互作用して、その活性を活性化または阻害す
15 るかどうかを決定することを含む方法。

13. 請求の範囲第1項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第3項もしくは第4項に記載のポリヌクレオチドの活性または生理学的作用を阻

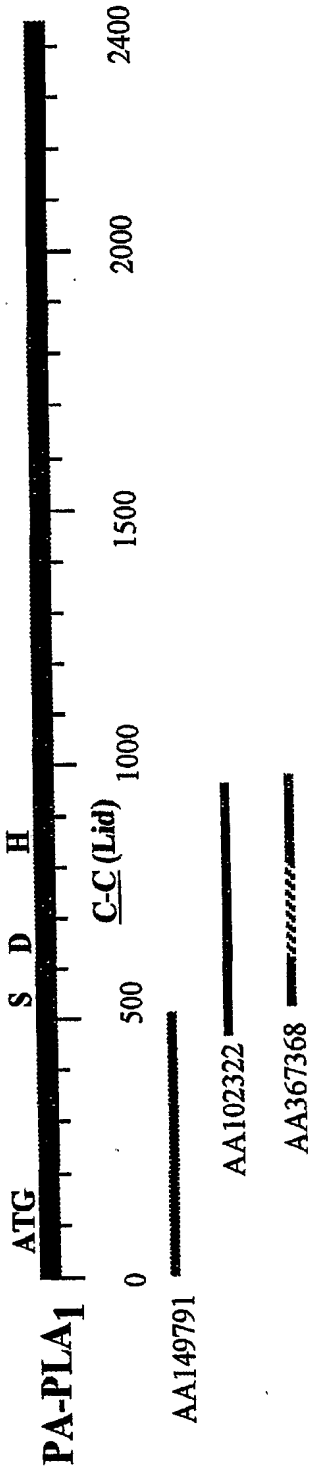
- 害もしくは活性化する化合物の同定方法であって、請求の範囲第 7 項に記載の形質転換体と、該形質転換体中で発現される請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドがホスファチジン酸に作用することにより生産されるリゾホスファチジン酸に対する受容体を発現させた別の形質転換体とを用い、化合物とこれら形質転換体の相互作用を可能にする条件下で、これら形質転換体とスクリーニングすべき化合物とを接触させて化合物の相互作用を評価し（かかる作用は形質転換体と化合物との相互作用に応答した検出可能シグナルを提供し得る第 2 の成分に関連したものである）、次いで、化合物と形質転換体との相互作用により生じるシグナルの存在または不存在またはその変化を検出することにより、化合物がポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性または生理学的作用を、活性化または阻害するかどうかを決定することを含む方法。
- 1 4. 請求の範囲第 1 1 項ないし第 1 3 項に記載の方法で同定される化合物。
- 5 1 5. 請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドと相互作用してその活性を阻害もしくは活性化する化合物、または請求の範囲第 3 項もしくは第 4 項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物。
- 0 1 6. 請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載のポリペプチドもしくはペプチド、請求の範囲第 3 項ないし第 5 項に記載の何れかのポリヌクレオチド、請求の範囲第 6 項に記載のベクター、請求の範囲第 7 項に記載の形質転換体、請求の範囲第 9 項もしくは第 1 0 項に記載の抗体、または請求の範囲第 1 4 項または第 1 5 項に記載の化合物のうち、少なくとも何れか一つを含有することを特徴とする医薬組成物。
- 5 1 7. 個体における請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドの発現または活性に関連した疾病の診断方法であって、（a）該ポリペプチドをコードしている核酸配列、および／または（b）個体由来の試料中の該ポリペ

プチドをマーカーとして分析することを含む方法。

18. 請求の範囲第16項に記載の医薬組成物をホスホリパーゼA₁に関連する疾患に用いることを特徴とする治療方法。
19. 請求の範囲第16項に記載の医薬組成物の製造方法。

図 1

新規リパーゼ塩基配列・EST塩基配列関係図



2/15

2

CACGAGAAAA TCCCACAGTG GAAACTCTTA AGCCTCTGCG AAGTAAATCA GAATTCGG
 TGTGACACAC GATCTCTCCA GTTTCATAT GTTGAGATTC TACTTATTCA TTCTTGTGAA
 GTGCTTGTCA AGATCAGACG CAGAAGAAAC M L R F Y L F I S L L
C L S R S D A E E T C P S F T R L S F H
 CAGTGCAGTG GTTGGTACGG GACTAAATGT GAGGCTGATG CTCTACACAA GGAAAAACCT
 S A V V G T G L N V R L M L Y T R K N L
 GACCTGCGCA CAAACCATCA ACTCCTCAGC TTTTGGGAAC TTGAATGTGA CCAAGAAAAC
T C A Q T I N S S A F G N L N V T K K T
 CACCTTCATT GTCCATGGAT TCAGGCCAAC AGGCTCCCCT CCTGTTTGGG TGGATGACTT
 T F I V H G F R P T G S P P V W M D D L
 AGTAAAGGGT TTGCTCTCTG TTGAAGACAT GAACGTAGTT GTTGTGATT GGAATCGAGG
 V K G L L S V E D M N V V V V D W N R G
 AGCTACAAC TTAATATATA CCCATGCCTC TAGTAAGACC AGAAAAGTAG CCATGGTCTT
 A T T L I Y T H A S S K T R K V A M V L
 GAAGGAATTT ATTGACCAGA TGTGGCAGA AGGAGCTTCT CTTGATGACA TTTACATGAT
 K E F I D Q M L A E G A S L D D I Y M I
 CGGAGTAAGT CTAGGAGCCC ACATATCTGG GTTGTGTTGGA GAGATGTACG ATGGATGGCT
 G V S L G A H I S G F V G E M Y D G W L
 GGGGAGAATT ACAGGCCTCG ACCCTGCAGG CCCTTTATTC AACGGGAAAC CTCACCAAGA
 G R I T G L S P A G P L F N G K P H Q D
 CAGATTAGAT CCCAGTGATG CGCAGTTTGT TGATGTCATC CATTCCGACA CTGATGCACT
 R L D P S D A Q F V D V I H S D T D A L
 GGGCTACAAG GAGCCATTAG GAAACATAGA CTTCTACCCA AATGGAGGAT TGGATCAACC
 G Y K E P L G N I D F Y P N G G L D Q P
 TGGCTGCCCC AAAACAATAT TGGGAGGATT TCAGTATTTT AAATGTGACC ACCAGAGGTC
 G C P K T I L G G F Q Y F K C D N Q R S
 TGTATACCTG TACCTGTCTT CCCTGAGAGA GAGCTGCACC ATCACTGCGT ATCCCTGTGA
 V Y L Y L S S L R E S C T I T A Y P C D
 CTCCTACCAG GATTATAGGA ATGGCAAGTG TGTCAGCTGC GGCACGTCAC AAAAAGAGTC
 S Y Q D Y R N G K C V S C G T S Q K E S
 CTGTCCCCTT CTGGGCTATT ATGCTGATAA TTGGAAAGAC CATCTAAGGG GGAAAGATCC
 C P L L G Y Y A D N W K D H L R G K D P
 TCCAATGACG AAGGCATTCT TTGACACAGC TGAGGAGAGC CCATTCTGCA TGTATCATTA
 P M T K A F F D T A E E S P F C M Y H Y
 CTTTGTGGAT ATTATAACAT GGAACAAGAA TGTAAGAAGA GGGGACATTA CCATCAAATT
 F V D I I T W N K N V R R G D I T I K L
 GAGAGACAAA GCTGGAAACA CCACAGAATC CAAAATCAAT CATGAACCCA CCACATTTCA
 R D K A G N T T E S K I N H E P T T F Q
 GAAATATCAC CAAGTGAGTC TACTTGCAAG ATTTAATCAA GATCTGGATA AAGTGGCTGC
 K Y H Q V S L L A R F N Q D L D K V A A
 AATTTCCTTG ATGTTCTCTA CAGGATCTCT AATAGGCCCA AGGTACAAGC TCAGGATTCT
 I S L M F S T G S L I G P R Y K L R I L
 CCGAATGAAG TTAAGGTCCC TTGCCCATCC GGAGAGGCCT CAGCTGTGTC GGTATGATCT
 R M K L R S L A H P E R P Q L C R Y D L
 TGTCTGATG GAAAACGTTG AAACAGTCTT CCAACCTATT CTTTGCCAG AGTTGCAGTT
 V L M E N V E T V F Q P I L C P E L Q L
 GTAAGTGTG CCAGGACACA TGGCCATAAA TAATAGAAAG AAAGCTACAA CCACAGGCTG

*

図 2 つづき

```
TTTGAAAGCT TCACCTCACC TTTCTGCAAA GCAGAAAAAG TATGAAAAAA CCAAGGCTTT
TTTCAGTAGC GTCCTATGGA TGTCACATTG TACATCAAAC AACCTTGTGA TTATAAACG
ATCCTGGGAA GGAGCCCCTA ACTAGGGCAA GTCAGAAATA GCCAGGCTCG CAGCAGCGCA
GCGCTGTGTC TGCTGTGTCC TGGGGCCTCC CTTGTTCCGA CCTGTCAATT CTGCTGCCTG
TCACGCGGGT GGTTCCTGCCC ATCGCGGCTG CGGGTCAAGC ATCTTCAAGG GAAGGACGGA
CTGGAGGCCT CACCGTGGAC TCAACTCTGC ATTCTCCGTG CCACATTCCT CCAGTTCCCA
CACGTAGAAG GGAACGAAAC TGACGTCTAC CTCATGGGGC TGCTGTGTGG GTTTGGGAGG
CAAAAATCTA TGAAGGGTTT TTTGAAATCC CATAGGTGCC ACATCTATGA GATGTTTGAT
AAATGTGAAT ATGCTTTTAC ATTTGGGCTT ATCTAATTG CAATAAGAGA GCCTCTCTCT
ATCAACACCA GCTTCTCTCT CGGGCTGTTT GCTCAGGGAA GGCAAGAAAG CCACGTGCTG
GCCCTCTGCC TTCTCTAAAG TGCTGTTGGA GCATGGAGGA GCTGGAGGAG ATGGGGATGG
ACTGACAGCT AAGAGGGCGG CTGCTGGGAC TAGATAGTGG ATGAAGAAAG AAGGACGAGG
AAGCCGTGGG GCAGCCTCTT CACATGGGGA CAGGGGATGG AGCATGAGGC AGGGGAAGGA
AAAGCAGAGC TTATTTTTCA CCTAAGGTGG AGAAGGATCA CTTTACAGGC AACGCTCATT
TTAAGCAACC CTTAAGAAAT GTTTATGTTT CTTTATTACC AATGTAATCT ATGATTATTG
AAGGAAATTT AGAAAATGCG TAGATACAAA AAAAAAAAAA AAAAATCTCGA G
```

3

新規 PLA₁
 plrp1
 plrp2
 肝臓型リパーゼ
 hps-PLA₁
 ヒト膀胱型リパーゼ
 リボプロテインリパーゼ

1: M-L-RF--YLF--SL-LCLSRSDAETCP-SFTR-LSFHA-VV-GTGLNVRIMLYTRKN 50
 1: MLFWITLTLFLLGAAGKEVCYEDLGCFSDETPWGGTAIRPLKILPWSPEKIGTRFLLYT 60
 1: MLPPWTLLGLLLATVRGKEVCYQOLGCFSDPEKWPAGTLQRPVKLLPWSPEKIDTRFLLYT 60
 1: MDTSPCLFSLILVLCIFIQSSALQSLKPEPEFGRRQAQAVETNKTLEHMKTRFL-LFGETN 59
 1: MPPGPWESCFWVGGLILWLSSGSDAPPTQPKCADFOSANLFFGTDLKVQFLFVPSN 60
 1: MLPLWTLSL-LLGAVAGKEVCYERLGCFSDDSPSGITERPLHILPWSPKDVTNTRFLLYT 59
 1: MESKAL-L-V-LTAVWLQSLTASRGVAAA-DQRRDFIDIESKF-ALRTP---E-DTAE 51

新規 PLA₁
 plrp1
 plrp2
 肝臓型リパーゼ
 hps-PLA₁
 ヒト膀胱型リパーゼ
 リボプロテインリパーゼ

51: LTCQQTIN-SSAF--GNLNVTKTTFIVHGRPTGSPVWMDLKVGL--LSVEDMNV-- 103
 61: NENPNFQILLLSDPSTIEASNFQMDRKTRFIIHGFDKDESWVTDCKKLFEEVEVNC 120
 61: NENPNFQILITGTEPDTIEASNFQMDRKTRFIIHGFDKDESWVTDCKKMFEEVNC 120
 60: QGQOIRINHPDTLOECGFNSLPLVMIHGWSDGVLENWIWQVAAAL--KSQPAQPVNV 117
 61: PSCGQIVGSSDLQNSGFNATLGTKLIHGRVLTGTPSWIDTFIRTL--LRATNANV-- 116
 60: NENPNFQIE--VAADSSISGSNFKTNKTRFIIHGFDKGEENWLANVCKNLFKVESVNC 118
 52: DTCHLIPGVAESVATCFHNSKTFMVIHGWTVTGMYESWVPKLVAAL--YKREPDS-NV 108

新規 PLA₁
 plrp1
 plrp2
 肝臓型リパーゼ
 hps-PLA₁
 ヒト膀胱型リパーゼ
 リボプロテインリパーゼ

104: VVVDWNRGATTLIYTHASSKTRKVMVLKEFIDQMLAEGASLDDIYMGVSLGAHISGFV 163
 121: ICVDWKKGSQATVTQAANNVRVVGAAQVAQMLDILLTEYSYPPSKVHLIGHSLGAHVAGEA 180
 121: ICVDWRRHGSRAMYTQAVONIRVVGAETAFLIQAALSTQLGYSLEDVHVIGHSLGAHTAAEA 180
 118: GLVDWITLAHDHYTIAVRNTRLVGKEVAALIRLEESVQLSRSHVHLIGHSLGAHVSGFA 177
 117: IAVDWIYGSTG-VYFSAKVNLIKLSLEISLFLNKLVLGVSESSIIHIGVSLGAHVGMV 175
 119: ICVDWKKGSRTGYTQASQIRIVGAEVAYFVEFLOSAFGYSPSNVHVIGHSLGAHAAAGEA 178
 109: IVVDWLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVAFINWMEEFNYPLDNVHLLGYSLGAHAAAGIA 168

新規 PLA₁
 plrp1
 plrp2
 肝臓型リパーゼ
 hps-PLA₁
 ヒト膀胱型リパーゼ
 リボプロテインリパーゼ

164: G--EMYDGLGRITGLDPAGPLFNGKPHQDRLDPSDAQFVDVIHSD-----TDALGYKE 215
 181: G--SKTPG-LSRITGLDPVEASFESTPEEVRLDPSDADFVDVIHTDAAPLIPFLGFGTNQ 237
 181: G--RRLGGRVGRITGLDPAGPCFQDEPEEVRLDPSDAVFVDVIHTDSSPIVPSLGFMSQ 238
 178: GSSIGGTHKIGRITGLDAAGPLFEGSAPSNRLSPDDANFVDIAHT-FTREHMGLSVGIKQ 236
 176: G--QLFGGLGQITGLDPAGPEYTRASVEERLDAGDALFVEAHTD-----TDNLGIRI 227
 179: G--RRRTNGTIGRITGLDPAEPCFQGTPELVRLDPSDAKFVDVIHTDGAIPVNLGFGMSQ 236
 169: G-SL-TNKKVNRITGLDPAGPNTEYAEAPSRSLSPDDADFVDVLHT-FTRGSPGRSIGIQK 225

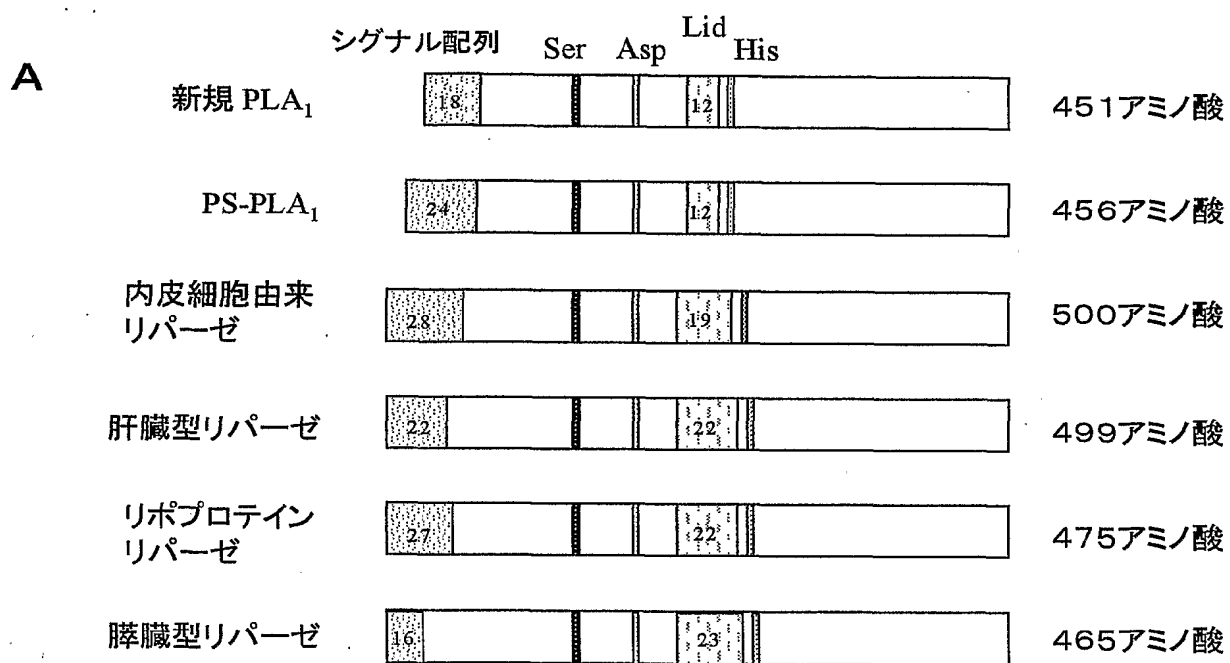
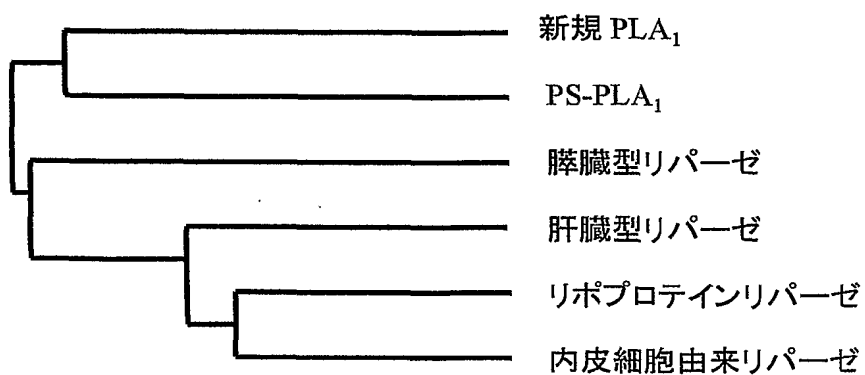
新規 PLA₁
 plrp1
 plrp2
 肝臓型リパーゼ
 hps-PLA₁
 ヒト膀胱型リパーゼ
 リボプロテインリパーゼ

216: PLGNIDFYPNGGLDQPGC-----PKTILGG-----FOYFKCDHOR-SVYLYLSSLRESC 263
 238: QMGHLDFFPNGGESMPGCKKNALSQIVDLDDGIWAGTRDFVACNHLRSYKYLESIIINPDG 297
 239: KVGHLDFFPNGGKEMPCKKNVLSITIDIDIGIEGIGGVSCNHLRSFEYSSSVINPDG 298
 237: PIGHYDFYPNGGSFQPGCHSLELYRHIAQHG-FNAITQIKCSHERSVHLFIDSLHAGT 295
 228: PVGHVDYFVNGGQDQPGC-----PTFFYAG-----YSYLICDHMR-AVHLYISALENSC 275
 237: VVGHLDFFPNGGVEMPGCKKNILSQIVDIDIGIEGTRDFAACNHLRSYKYTYTDSIVNPDG 296
 226: PVGHVDIYPNGGTFQPGCNIGEAIRVIAERG-LGDVDQLVKCSHERSIHLFIDSLLINEEN 284

図 3 う り ぬ

新規 PLA ₁	264: TITAYPCDSYQDYRNGKVCSCGTSQKESCLLGGYADNWKDHRLRGKDPMTKAFDFTAEE	323
plrp1	298: F-AAYPCTSYKSFESDKCFPCDQCPQMGHYADKFAGRTSEEQQKFNLNTGEASNFARW	356
plrp2	299: F-LGYPCASYDEFESKCFPCPAEGCPKMGHYADQFKGKTSAVEQTFFLNTGESGNFTSW	357
肝臓型リパーゼ	296: QSMAYPCGDMNSFQGLCLCKKGRCNTLG-YHVRQEPRSKSKRLFLVTRAQSPFKVYHY	354
hPS-PLA ₁	276: PLMAFFPCASYKAFLAGRCLDCFNPELLSCPRIGLVEQG-GVKI-EPLPKFVKVYLLTSS	333
ヒト膝臓型リパーゼ	297: F-AGFFPCASYNVFTANKCFPCPSGGCPQMGHYADRYPGKTNVDVGKFYLDTGDAENFARW	355
リボプロテインリパーゼ	285: PSKAYRCSSKEAFEKGLCLSCRKNRCNNLG-YEINKVRAKRSSKMYLKTTRSQMPYKVFHY	343
新規 PLA ₁	324: SPFCMYHYFVDIITWNKNVRRGDIITIKLRDKAGNTTESKINHEPTTFQKYHOVSLLARFN	383
plrp1	357: RYGV-S-ITLSG-RTATGQIKVALFGNKGNTHOY-SIFRGILKPGSTHSYEFDAKLDVGTI	413
plrp2	358: RYKVS-VTLSGKEKVNIGYIRIALYGSNENSKOY-EIFKGSCLKPDASHTCAIDVDENVGKI	415
肝臓型リパーゼ	355: OLKIQFI-NQETPIQTTFTMSLLGTKEKMQKIPITLKGASNKTYSFILTLDDVDIGEL	413
hPS-	334: APYCMHHSLEFFHLKELRNKDTNIEVFL-SSNITSSSKIT-IPKQ-QRYGK-GIIAHAT	389
PLA ₁	356: RYKVS-VTLSG-KKVTGHILVSLFGNKGNSKOY-EIFKGTCLKPDSTHSNEFSDSDVDVGD	412
リボプロテインリパーゼ	344: QVKIHFSGTESEHTNQAFEISLYGTVAESENIPFTL-PEVSTNKTYSFILYTEVDIGEL	402
新規 PLA ₁	384: QDLDKVAAISIMFSTGSLIGPRYKIRIL-RMKLRSLAHPERPQL-CRYDLV-LMENVETV	440
plrp1	414: EKVKFLWNNNVINPTLPKVGATKITVQKGEKTVYNFCSEDTVREDTLLTLP-C-----	467
plrp2	416: QKVKFLWNNKRGINLSEPKLGASQITVQSGEDGTEYNFCSSDTEENVLSLYP-C-----	469
肝臓型リパーゼ	414: IMIKFKWENSADVWANY-WDTVQTIIPWSTGPRHSGLVLTIRVKAGETQQRMTFCSENTD	472
hPS-PLA ₁	390: PQ-CQINQVKKFKQSSNRVWKKDRITIIIGKFTALLPVNDREKMWCLPEPVNLQASVTVS	448
ヒト膝臓型リパーゼ	413: QMVKFIWYNNVINPTLPRVGASKIIVETNVGKQ-FNFCSPETVREEVLLTLP-C-----	465
リボプロテインリパーゼ	403: IMLKCLKWKSDSYF-S--W-S-D-----WWSSP---GFAIQIRVKAGETQKKVIFCSREKV	450
新規 PLA ₁	441: FQ-PILCPLELQL-----	451
plrp1	468: -----	468
plrp2	470: -----	470
肝臓型リパーゼ	473: DILLRPTQEKIFVKCEISKTSKRKIR	498
hPS-PLA ₁	449: CDLKACV-----	456
ヒト膝臓型リパーゼ	466: -----	466
リボプロテインリパーゼ	451: SHLQKGKAPAVFVKCH-DKSLNKKSG	475

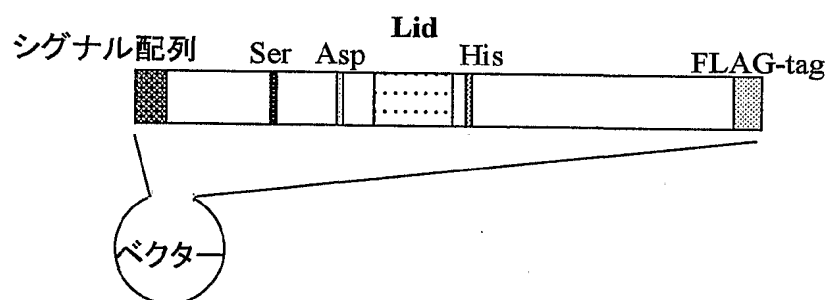
図 4

**B**

7/15

図 5

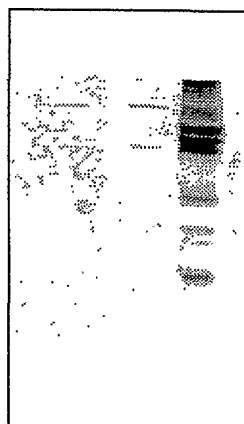
A



B

分子量 (kDa)

83 —
62 —
47.5 —
32.5 —
25 —
16.5 —
6.5 —



1次抗体: 抗 FLAG 抗体

2次抗体: 抗マウスイムノグロブリン抗体

レーン1; 野生型バキュロウイルス感染細胞／培養上清

レーン2; 野生型バキュロウイルス感染細胞／細胞画分

レーン3; FLAG-tag新規PLA₁／培養上清レーン4; FLAG-tag新規PLA₁／細胞画分

1 2 3 4

野生型 新規 PLA₁

図 6

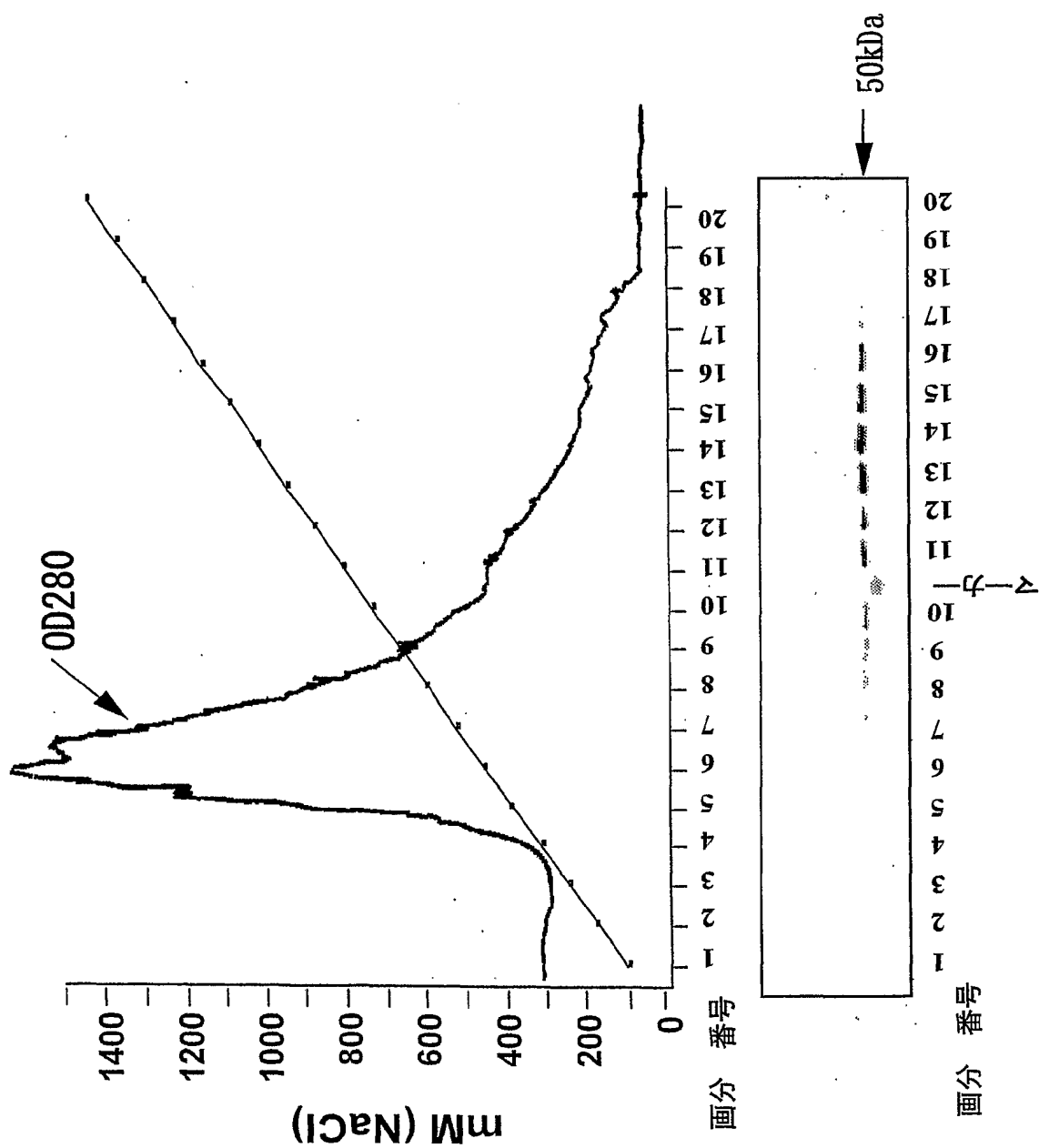
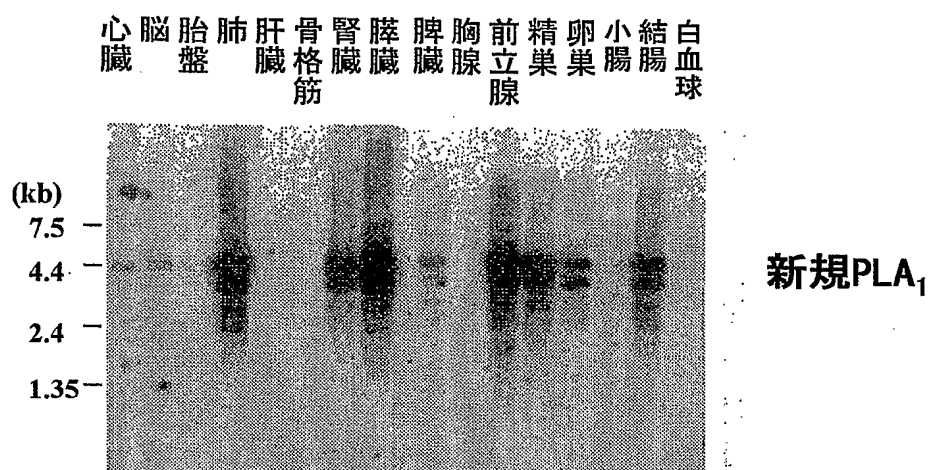
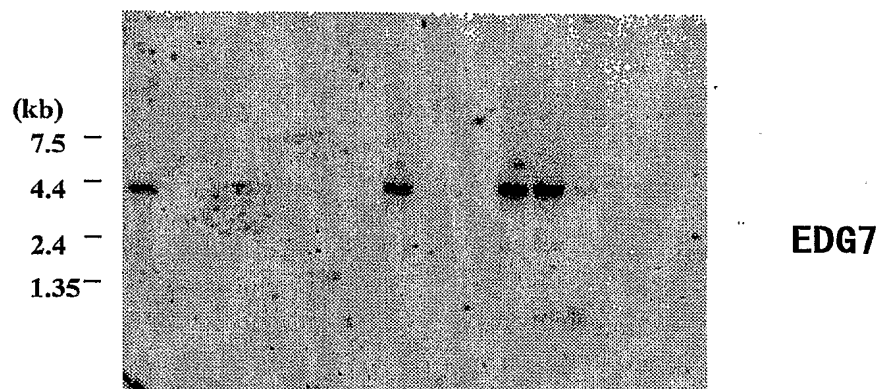


図 7

A



B

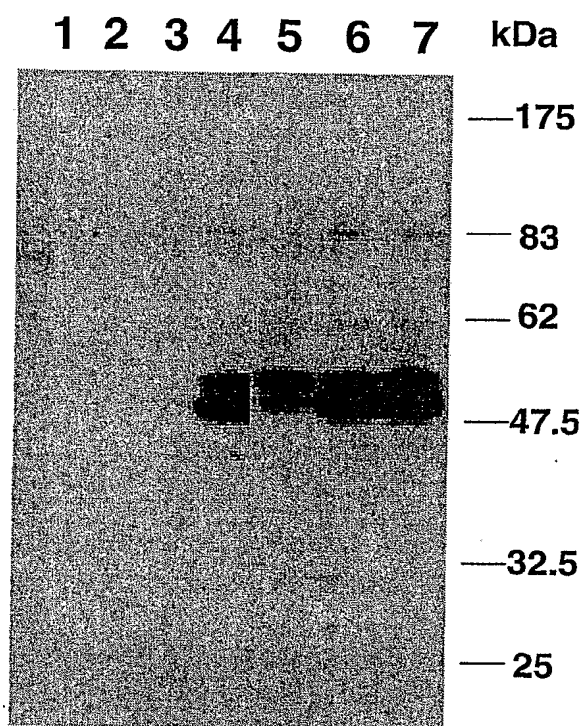


C



10/15

図 8



1, 4 : Ovcar-3

1, 2, 3 : 培養上清

2, 5 : Ovcar-5

4, 5, 6, 7 : 細胞

3, 6 : Ovcar-8

7 : ヒト血小板

図 9

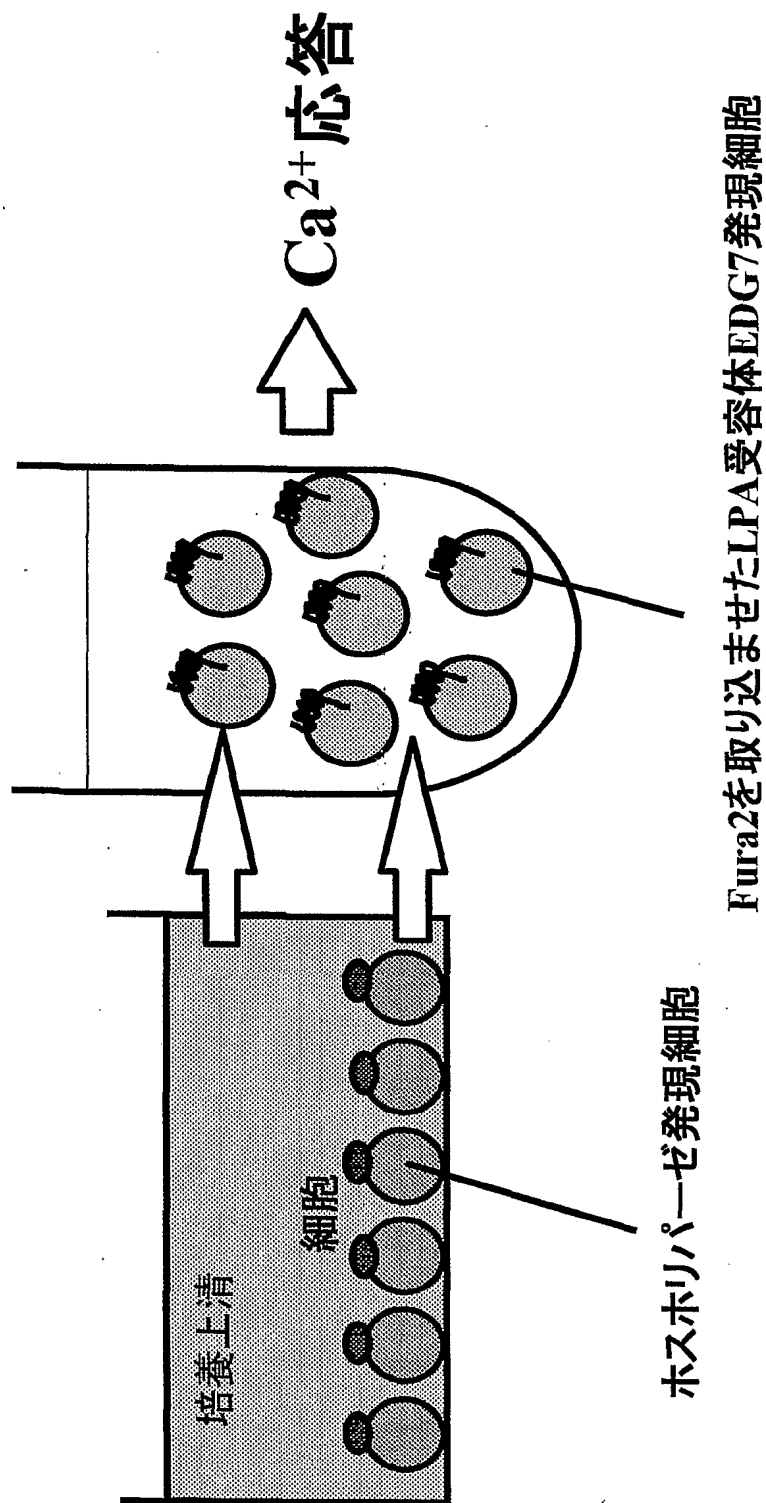


図 1 0

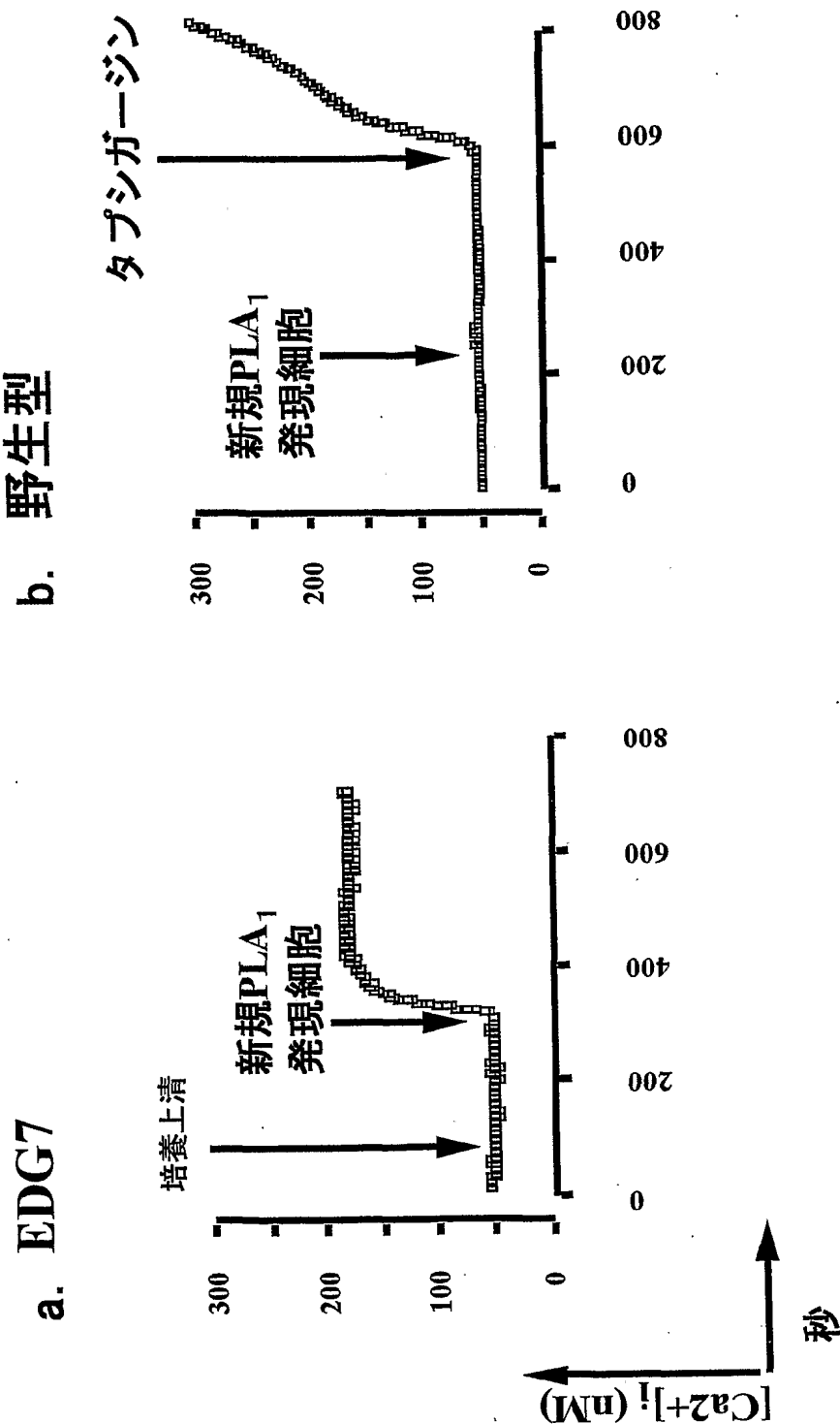
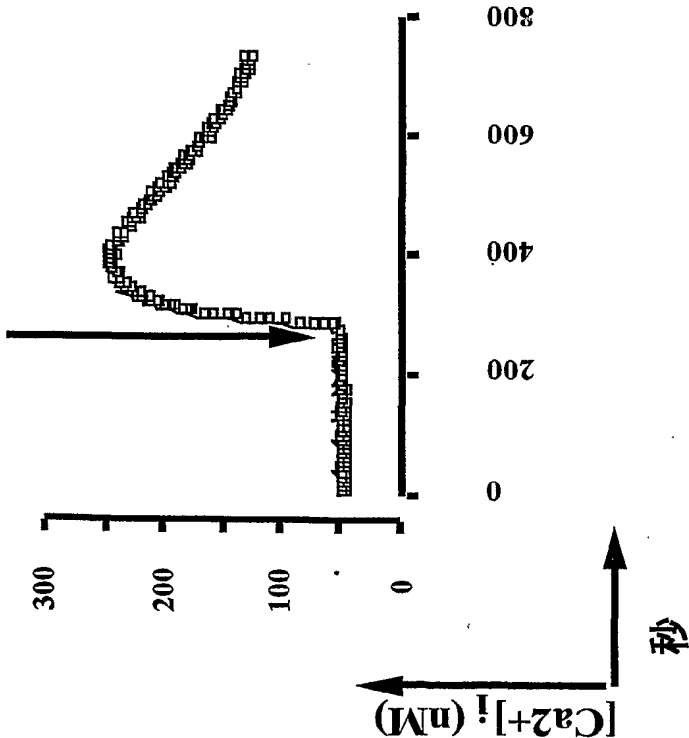


図 10 つづき

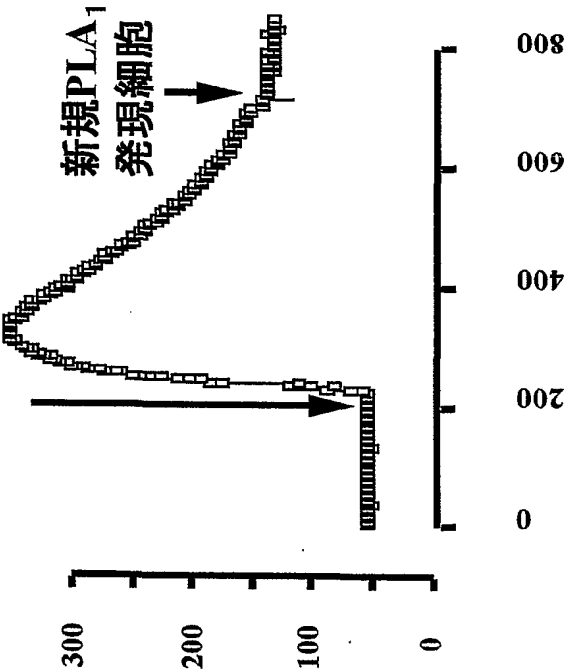
c. EDG7

LPA (1-oleoyl, 100nM)



d. EDG7

LPA (1-oleoyl, 1 μ M)



14/15

図 10 つづき

e. EDG7

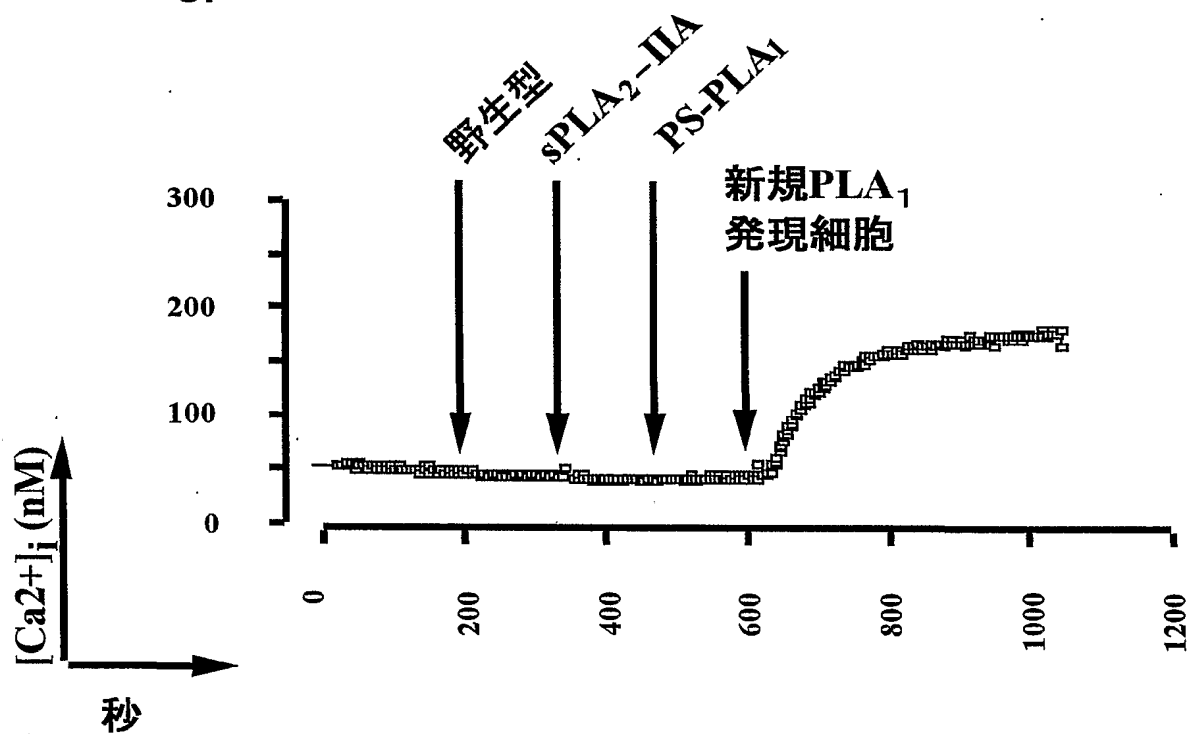
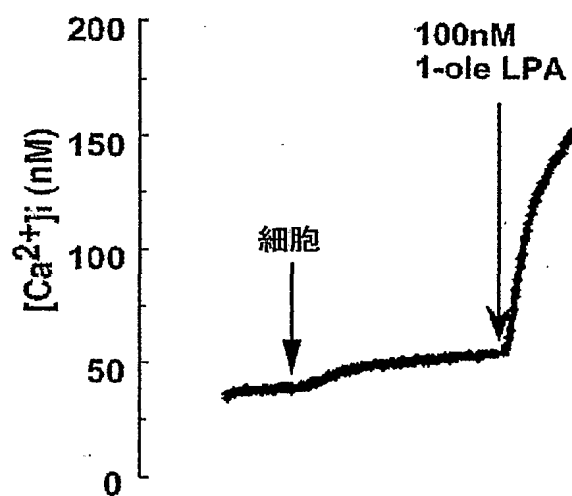
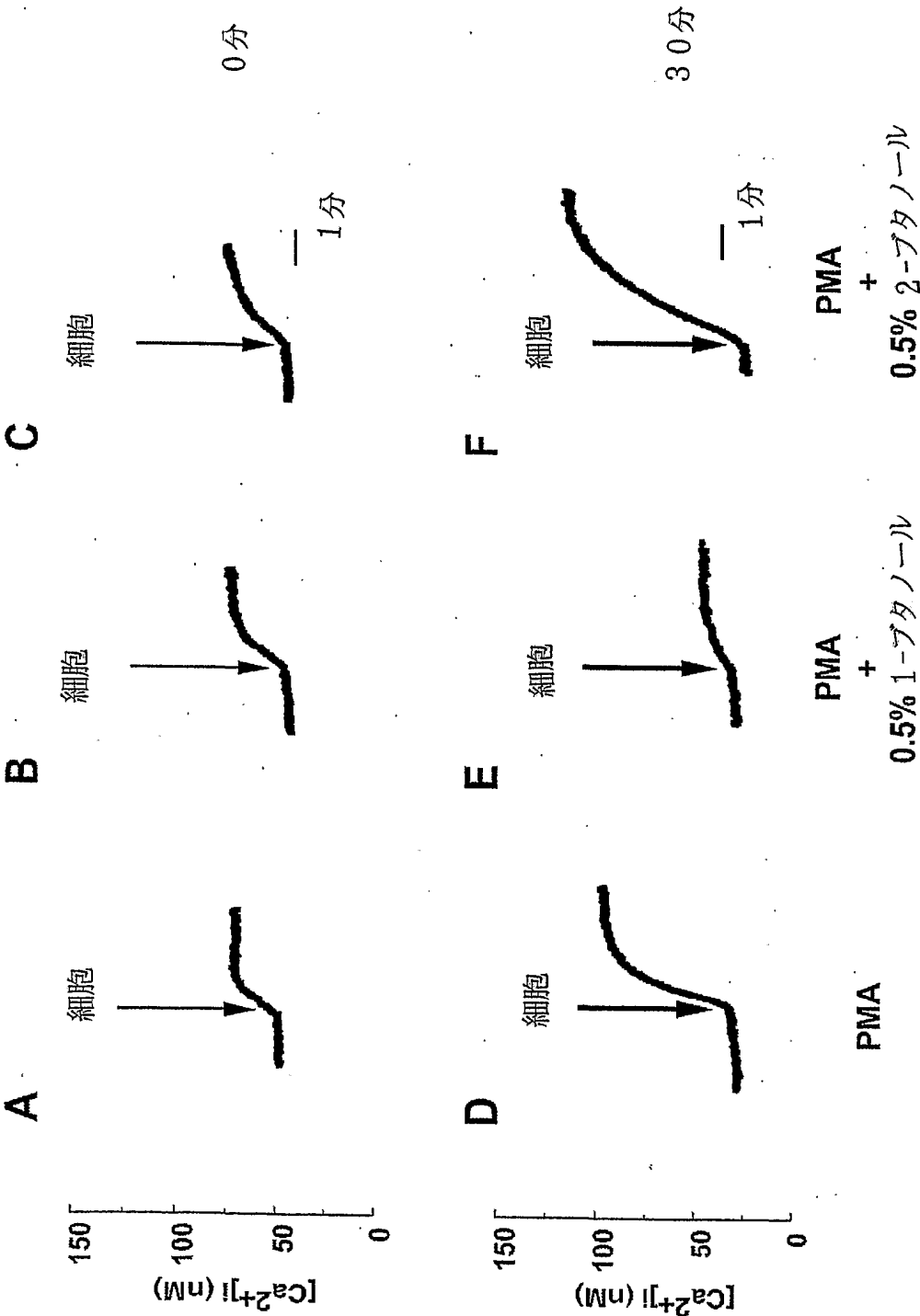
f. Ser → Ala 新規 PLA₁
+
EDG7

図 1 1



SEQUENCE LISTING

<110> Mochida Pharmaceutical Co., Ltd

5 <120> A novel lipase

<130> GP00-1011

<160> 8

10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 451

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Leu Arg Phe Tyr Leu Phe Ile Ser Leu Leu Cys Leu Ser Arg Ser

20 1 5 10 15

Asp Ala Glu Glu Thr Cys Pro Ser Phe Thr Arg Leu Ser Phe His Ser

20 25 30

25 Ala Val Val Gly Thr Gly Leu Asn Val Arg Leu Met Leu Tyr Thr Arg

35 40 45

Lys Asn Leu Thr Cys Ala Gln Thr Ile Asn Ser Ser Ala Phe Gly Asn
50 55 60

Leu Asn Val Thr Lys Lys Thr Thr Phe Ile Val His Gly Phe Arg Pro
5 65 70 75 80

Thr Gly Ser Pro Pro Val Trp Met Asp Asp Leu Val Lys Gly Leu Leu
85 90 95

10 Ser Val Glu Asp Met Asn Val Val Val Val Asp Trp Asn Arg Gly Ala
100 105 110

Thr Thr Leu Ile Tyr Thr His Ala Ser Ser Lys Thr Arg Lys Val Ala
115 120 125

15

Met Val Leu Lys Glu Phe Ile Asp Gln Met Leu Ala Glu Gly Ala Ser
130 135 140

Leu Asp Asp Ile Tyr Met Ile Gly Val Ser Leu Gly Ala His Ile Ser
20 145 150 155 160

Gly Phe Val Gly Glu Met Tyr Asp Gly Trp Leu Gly Arg Ile Thr Gly
165 170 175

25 Leu Asp Pro Ala Gly Pro Leu Phe Asn Gly Lys Pro His Gln Asp Arg
180 185 190

Leu Asp Pro Ser Asp Ala Gln Phe Val Asp Val Ile His Ser Asp Thr
195 200 205

5 Asp Ala Leu Gly Tyr Lys Glu Pro Leu Gly Asn Ile Asp Phe Tyr Pro
210 215 220

Asn Gly Gly Leu Asp Gln Pro Gly Cys Pro Lys Thr Ile Leu Gly Gly
225 230 235 240

10 Phe Gln Tyr Phe Lys Cys Asp His Gln Arg Ser Val Tyr Leu Tyr Leu
245 250 255

Ser Ser Leu Arg Glu Ser Cys Thr Ile Thr Ala Tyr Pro Cys Asp Ser
260 265 270
15

Tyr Gln Asp Tyr Arg Asn Gly Lys Cys Val Ser Cys Gly Thr Ser Gln
275 280 285

Lys Glu Ser Cys Pro Leu Leu Gly Tyr Tyr Ala Asp Asn Trp Lys Asp
20 290 295 300

His Leu Arg Gly Lys Asp Pro Pro Met Thr Lys Ala Phe Phe Asp Thr
305 310 315 320

25 Ala Glu Glu Ser Pro Phe Cys Met Tyr His Tyr Phe Val Asp Ile Ile
325 330 335

Thr Trp Asn Lys Asn Val Arg Arg Gly Asp Ile Thr Ile Lys Leu Arg
340 345 350

5 Asp Lys Ala Gly Asn Thr Thr Glu Ser Lys Ile Asn His Glu Pro Thr
355 360 365

Thr Phe Gln Lys Tyr His Gln Val Ser Leu Leu Ala Arg Phe Asn Gln
370 375 380

10 Asp Leu Asp Lys Val Ala Ala Ile Ser Leu Met Phe Ser Thr Gly Ser
385 390 395 400

15 Leu Ile Gly Pro Arg Tyr Lys Leu Arg Ile Leu Arg Met Lys Leu Arg
405 410 415

Ser Leu Ala His Pro Glu Arg Pro Gln Leu Cys Arg Tyr Asp Leu Val
420 425 430

20 Leu Met Glu Asn Val Glu Thr Val Phe Gln Pro Ile Leu Cys Pro Glu
435 440 445

Leu Gln Leu
450

25

<210> 2

<211> 2445

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

5 <221> CDS

<222> (89).. (1441)

<400> 2

cacgagaaaa tcccacagtg gaaactctta agcctctgog aagtaaata ttctttgtgaa 60

10

tgtagacacac gatctctcca gtttccat atg ttg aga ttc tac tta ttc atc 112

Met Leu Arg Phe Tyr Leu Phe Ile

1

5

15 agt ttg ttg tgc ttg toa aga toa gac goa gaa gaa aca tgt oot toa 160

Ser Leu Leu Cys Leu Ser Arg Ser Asp Ala Glu Glu Thr Cys Pro Ser

10

15

20

ttc acc agg ctg agc ttt cac agt gca gtg gtt ggt acg gga ota aat 208

20 Phe Thr Arg Leu Ser Phe His Ser Ala Val Val Gly Thr Gly Leu Asn

25

30

35

40

gtg agg ctg atg ctc tac aca agg aaa aac ctg acc tgc gca caa acc 256

Val Arg Leu Met Leu Tyr Thr Arg Lys Asn Leu Thr Cys Ala Gln Thr

25

45

50

55

atc aac tcc toa got ttt ggg aac ttg aat gtg acc aag aaa acc acc 304

Ile Asn Ser Ser Ala Phe Gly Asn Leu Asn Val Thr Lys Lys Thr Thr

60

65

70

ttc att gtc cat gga ttc agg cca aca ggc tcc cct cct gtt tgg atg 352

5 Phe Ile Val His Gly Phe Arg Pro Thr Gly Ser Pro Pro Val Trp Met

75

80

85

gat gac tta gta aag ggt ttg ctc tct gtt gaa gac atg aac gta gtt 400

Asp Asp Leu Val Lys Gly Leu Leu Ser Val Glu Asp Met Asn Val Val

10

90

95

100

gtt gtt gat tgg aat cga gga gct aca act tta ata tat acc cat gcc 448

Val Val Asp Trp Asn Arg Gly Ala Thr Thr Leu Ile Tyr Thr His Ala

105

110

115

120

15

tct agt aag acc aga aaa gta gcc atg gtc ttg aag gaa ttt att gac 496

Ser Ser Lys Thr Arg Lys Val Ala Met Val Leu Lys Glu Phe Ile Asp

125

130

135

20 cag atg ttg gca gaa gga gct tct ctt gat gac att tac atg atc gga 544

Gln Met Leu Ala Glu Gly Ala Ser Leu Asp Asp Ile Tyr Met Ile Gly

140

145

150

gta agt cta gga gcc cac ata tct ggg ttt gtt gga gag atg tac gat 592

25 Val Ser Leu Gly Ala His Ile Ser Gly Phe Val Gly Glu Met Tyr Asp

155

160

165

gga tgg ctg ggg aga att aca ggc ctc gac cct gca ggc cct tta ttc 640
 Gly Trp Leu Gly Arg Ile Thr Gly Leu Asp Pro Ala Gly Pro Leu Phe
 170 175 180

5 aac ggg aaa cct cac caa gac aga tta gat ccc agt gat ggc cag ttt 688
 Asn Gly Lys Pro His Gln Asp Arg Leu Asp Pro Ser Asp Ala Gln Phe
 185 190 195 200

gtt gat gtc atc cat tcc gac act gat gca ctg ggc tac aag gag cca 736
 10 Val Asp Val Ile His Ser Asp Thr Asp Ala Leu Gly Tyr Lys Glu Pro
 205 210 215

tta gga aac ata gac ttc tac cca aat gga gga ttg gat caa cct ggc 784
 Leu Gly Asn Ile Asp Phe Tyr Pro Asn Gly Gly Leu Asp Gln Pro Gly
 15 220 225 230

tgc ccc aaa aca ata ttg gga gga ttt cag tat ttt aaa tgt gac cac 832
 Cys Pro Lys Thr Ile Leu Gly Gly Phe Gln Tyr Phe Lys Cys Asp His
 235 240 245

20 cag agg tct gta tac ctg tac ctg tct tcc ctg aga gag agc tgc acc 880
 Gln Arg Ser Val Tyr Leu Tyr Leu Ser Ser Leu Arg Glu Ser Cys Thr
 250 255 260

25 atc act ggc tat ccc tgt gac tcc tac cag gat tat agg aat ggc aag 928
 Ile Thr Ala Tyr Pro Cys Asp Ser Tyr Gln Asp Tyr Arg Asn Gly Lys
 265 270 275 280

tgt gtc agc tgc ggc acg tca caa aaa gag tcc tgt ccc ctt ctg ggc 976
 Cys Val Ser Cys Gly Thr Ser Gln Lys Glu Ser Cys Pro Leu Leu Gly
 285 290 295

5

tat tat gct gat aat tgg aaa gac cat cta agg ggg aaa gat cct cca 1024
 Tyr Tyr Ala Asp Asn Trp Lys Asp His Leu Arg Gly Lys Asp Pro Pro
 300 305 310

10 atg acg aag gca ttc ttt gac aca gct gag gag agc cca ttc tgc atg 1072
 Met Thr Lys Ala Phe Phe Asp Thr Ala Glu Glu Ser Pro Phe Cys Met
 315 320 325

tat cat tac ttt gtg gat att ata aca tgg aac aag aat gta aga aga 1120
 15 Tyr His Tyr Phe Val Asp Ile Ile Thr Trp Asn Lys Asn Val Arg Arg
 330 335 340

ggg gac att acc atc aaa ttg aga gac aaa gct gga aac acc aca gaa 1168
 Gly Asp Ile Thr Ile Lys Leu Arg Asp Lys Ala Gly Asn Thr Thr Glu
 20 345 350 355 360

tcc aaa atc aat cat gaa ccc acc aca ttt cag aaa tat cac caa gtg 1216
 Ser Lys Ile Asn His Glu Pro Thr Thr Phe Gln Lys Tyr His Gln Val
 365 370 375

25

agt cta ctt goa aga ttt aat caa gat ctg gat aaa gtg gct goa att 1264
 Ser Leu Leu Ala Arg Phe Asn Gln Asp Leu Asp Lys Val Ala Ala Ile

380 385 390

5 tcc ttg atg ttc tot aca gga tot cta ata ggc cca agg tac aag ctc 1312
Ser Leu Met Phe Ser Thr Gly Ser Leu Ile Gly Pro Arg Tyr Lys Leu
395 400 405

agg att ctc cga atg aag tta agg tcc ott gcc cat ccg gag agg cct 1360
Arg Ile Leu Arg Met Lys Leu Arg Ser Leu Ala His Pro Glu Arg Pro
410 415 420

10 cag ctg tgt cgg tat gat ctt gtc ctg atg gaa aac gtt gaa aca gtc 1408
Gln Leu Cys Arg Tyr Asp Leu Val Leu Met Glu Asn Val Glu Thr Val
425 430 435 440

15 ttc caa cct att ott tgc cca gag ttg cag ttg taactgttgc caggacacat 1461
Phe Gln Pro Ile Leu Cys Pro Glu Leu Gln Leu
445 450

ggccataaat aatagaaaga aagctacaac cacaggotgt ttgaaagctt cacctcacct 1521

20 ttctgcaaag cagaaaaagt atgaaaaaac caaggctttt ttcagtagcg toctatggat 1581

gtcacattgt acatcaaaca accttgtgat tataaaacga tcctgggaag gagcccotaa 1641

25 ctagggcaag tcagaaatag ccaggctcgc agoagcgcag cgctgtgtct gotgtgtcct 1701

ggggcctccc ttgttccgac ctgtcaatto tgotgcctgt cacgcgggtg gttctgccca 1761

tgcggctgc gggtoaagca tctcaaggg aaggacggac tggaggcctc accgtggact 1821

caactctgca ttctccgtgc cacattcctc cagttcccac acgtagaagg gaacgaaact 1881

5

gacgtctacc tcatggggct gctgtgtggg tttgggaggc aaaaatctat gaagggtttt 1941

ttgaaatccc ataggtgcca catctatgag atgtttgata aatgtgaata tgcttttaca 2001

10 tttgggctta tctaatttgc aataagagag cctctctcta tcaacaccag cttctctctc 2061

gggctgtttg ctcagggaag gcaagaaagc cacgtgctgg ccctctgcot tctctaaagt 2121

gctgttggag catggaggag ctggaggaga tggggatgga ctgacagcta agagggcggc 2181

15

tgctgggact agatagtgga tgaagaaaga aggacgagga agccgtgggg cagcctcttc 2241

acatggggac aggggatgga gcatgaggca ggggaaggaa aagcagagct tattttttcac 2301

20 ctaaggtgga gaaggatcac tttacaggca acgtcattt taagcaacc ttaagaaatg 2361

tttatgtttc tttattacca atgtaatcta tgattattga aggaaattta gaaaatgcgt 2421

agatacaaaa aaaaaaaaaa aaaa

2445

25

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

5 <400> 3

tgcgagtaa atcattcttg tgaa

24

<210> 4

10 <211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

15 tgtgacatcc ataggacgct actg

24

<210> 5

<211> 33

20 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

cgcgatcca tgttgagatt ctacttatto atc

33

25

<210> 6

<211> 60

<212> DNA

<213> Homo sapiens

5 <400> 6

ccggaattct tacttgatc atgctgctctt gtagtccaac tgcaactctg ggcaaagaat 60

<210> 7

10 <211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

15 ctgcgcacaa accatcaact cctc

24

<210> 8

<211> 24

20 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

aggggacagg actcttttttg tgac

24

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04441

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N9/16, C12N15/55, C07K16/40, A61K38/43

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N9/16, C12N15/55, C07K16/40, A61K38/43

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, CAS ONLINE, BIOSIS PREVIEWS, DDBJ/EMBL/GenBank/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 10-201479 A (Toray Industries, Inc.), 04 August, 1998 (04.08.98) (Family: none)	1-17,19
A	Henry Higgs et al., "Cloning of a Phosphatidic Acid-preferring Phospholopase A1 from Bovine Testis" J.Biol.Chem., Vol. 273 (1998) pp.5468-5477	1-17,19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 September, 2000 (26.09.00)Date of mailing of the international search report
24 October, 2000 (24.10.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04441

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 18
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 18 involves methods for treatment of the human body.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N9/16, C12N15/55, C07K16/40, A61K38/43

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N9/16, C12N15/55, C07K16/40, A61K38/43

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, CAS ONLINE, BIOSIS PREVIEWS, DDBJ/EMBL/GenBank/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 10-201479, A (東レ株式会社) 4. 8月. 1998 (04. 08. 98) ファミリーなし	1-17, 19
A	Henry Higgs et al. "Cloning of a Phosphatidic Acid-preferring Phospholipase A1 from Bovine Testis" J. Biol. Chem., 273巻 (1998) p. 5468-5477	1-17, 19

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 09. 00

国際調査報告の発送日

24.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加藤 浩

4B

9050

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

法第8条第3項（PCT 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

- 請求項 18 は、ヒトに対する治療方法の発明を含むものである。

3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。